



**JÚLIO MIGUEL VICENTE VIABILIDADE DO BIODIESEL DE MICROALGAS:
GOUVEIA OTIMIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO**



JÚLIO MIGUEL VICENTE GOUVEIA **Viabilidade do Biodiesel de Microalgas: Otimização de Técnicas de Extração**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Sistemas Energéticos Sustentáveis, realizada sob a orientação científica do Doutor Fernando José Neto Da Silva, Professor Auxiliar do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro e da Doutora Margarida Isabel Cabrita Marques Coelho, Professora Auxiliar do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais pelo esforço e sacrifício que fizeram, o que permitiu dar continuidade à minha formação, e aos meus amigos pelo apoio incondicional ao longo desta caminhada

O júri

Presidente: Doutor Luís António da Cruz Tarelho Professor Auxiliar,
Departamento de Ambiente e Ordenamento - Universidade de Aveiro

Vogal – Arguente Principal: Professora Doutora Maria Isabel da Silva
Nunes, Professora Auxiliar, Departamento de Ambiente e Ordenamento –
Universidade de Aveiro

Vogal – Orientador: Professor Doutor Fernando José Neto da Silva,
Professor Auxiliar, Departamento de Engenharia Mecânica – Universidade
de Aveiro

Agradecimentos

A realização da presente dissertação de mestrado só foi possível devido ao apoio e contributo de diversas pessoas ao longo de todo um ano de trabalho pelo que gostaria de deixar aqui umas poucas, mas sentidas, palavras de agradecimento:

ao Doutor Fernando Neto e à Doutora Margarida Coelho pela orientação do presente trabalho de dissertação, pela constante partilha de conhecimento, disponibilidade, paciência e apoio prestado durante a sua realização;

à investigadora Smritikana Dutta pelas explicações iniciais que foram uma mais-valia para me enquadrar com o ambiente laboratorial e com o tema em estudo que no início se mostrava um mundo praticamente desconhecido;

à docente Rita Teles pelo fornecimento de algum material essencial para o desenvolvimento do caso de estudo;

aos meus amigos João Oliva, Mário Machado, Rita Ferreira e Mariana Vilaça por me terem suportado e apoiado ao longo destes dois anos e por terem tido, sempre e essencialmente, uma enorme paciência para comigo;

à maltinha do voleibol pelo incentivo dado, contínua boa disposição e companheirismo demonstrado. Em especial à Bárbara Cônsul pelo enorme apoio e persistência que me permitiram dar por terminada esta etapa;

à minha família, em especial aos meus pais que me proporcionaram a possibilidade de frequentar o ensino superior e assim ir mais além nos horizontes.

Palavras-chave

Biodiesel, Microalgas, Extração Lipídica, Transesterificação

Resumo

Os problemas relacionados com o consumo energético e as emissões de poluentes relativas ao setor dos transportes representam seguramente a maior preocupação ao nível Europeu no que respeita aos gases com efeito de estufa e à poluição atmosférica. Uma das formas de resolver/minimizar estes problemas é através da aposta em combustíveis alternativos. Em particular, os biocombustíveis poderão ser uma alternativa interessante aos combustíveis convencionais. As microalgas, como matéria-prima para produção de biodiesel, apresentam-se com excelentes perspetivas de futuro e com vantagens competitivas no campo das energias renováveis. É nesta perspetiva que se enquadra o presente trabalho, cujos objetivos consistiram na extração de biodiesel a partir de microalgas secas (*Nannochloropsis gaditana* e *Scenedesmus sp.*) e na otimização das respetivas técnicas de extração lipídica. Verificou-se que, em função dos métodos e condições utilizadas, a espécie *Nannochloropsis gaditana* apresenta um potencial de produção de biodiesel superior à espécie *Scenedesmus sp.* (eficiências de extração de 24,6 (wt.%) e 9,4 (wt.%) respetivamente). Um método de rotura celular conjugado com o processo de extração lipídica via solvente orgânico é essencial, pois conseguiu-se um acréscimo de 42% no rendimento de extração, sendo 10 minutos o tempo ideal de operação. Solventes como o metanol e sistema de solventes diclorometano/metanol mostraram ser mais eficazes quando se pretende extrair lípidos de microalgas, com valores de eficiência de remoção de 30,9 (wt.%) e 23,2 (wt.%) respetivamente. De forma a valorizar os resultados obtidos no processo de extração recorreu-se à sua conversão em biodiesel através da transesterificação catalítica ácida, onde se obteve uma eficiência de conversão de 17,8 (wt.%) para a espécie *Nannochloropsis gaditana*.

Keywords

Biodiesel, Microalgae, Lipid Extraction, Transesterification

Abstract

The issues associated to energy consumption and pollutant emissions related to the transport sector surely represents the European biggest concern regarding the greenhouse gases and air pollution. One way to solve/minimize these problems is by investing in alternative fuels. Particularly, biofuels which could be an interesting alternative to conventional fuels. Additionally microalgae for biodiesel production are presented with excellent future perspectives and competitive advantages in the field of renewable energy. Concerning this matter the present study aim is the extraction of biodiesel from dry microalgae *Nannochloropsis gaditana* and *Scenedesmus sp.*, and optimization the lipid extraction techniques. It was found that, depending on the methods and conditions used, *Nannochloropsis gaditana* species have a higher potential for biodiesel production than the *Scenedesmus sp.* species obtaining yielded extraction efficiencies of 24.6 (wt.%) And 9.4 (wt.%) respectively. The cell rupture method in conjunction with the lipid extraction process through organic solvent is essential because it is achieved a 42% increase in extraction yield, being 10 minutes the ideal time operation. Solvents such as methanol and solvent system dichloromethane / methanol proved to be more effective when extracting lipid of microalgae, with removal efficiency values of 30.9 (wt.%) and 23.2 (wt.%) respectively. In order to value the results obtained in the extraction process it was used acidic catalytic transesterification to convert into biodiesel, which was obtain an efficiency of 17.8 (wt.%) for the species *Nannochloropsis gaditana*

Índice

1. Introdução	1
1.1. <i>Panorama Energético na Europa e em Portugal.....</i>	<i>1</i>
1.2. <i>Biocombustíveis</i>	<i>7</i>
1.3. <i>Biodiesel.....</i>	<i>8</i>
1.4. <i>Microalgas para produção de Biodiesel.....</i>	<i>13</i>
1.5. <i>Objetivos e Estrutura da Presente Dissertação</i>	<i>17</i>
2. Revisão Bibliográfica.....	19
2.2. <i>Colheita da biomassa microalgal.....</i>	<i>21</i>
2.3. <i>Extração de Lípidos.....</i>	<i>24</i>
2.4. <i>Conversão de Lípidos</i>	<i>28</i>
2.5. <i>Síntese.....</i>	<i>32</i>
3. Metodologia	33
3.1. <i>Materiais e Equipamentos</i>	<i>35</i>
3.2. <i>Processo de Extração Lipídica.....</i>	<i>36</i>
3.3. <i>Transesterificação</i>	<i>38</i>
4. Apresentação e Discussão de Resultados	41
4.1. <i>Extração Lipídica.....</i>	<i>41</i>
4.1.1. <i>Influência da aplicação do banho de ultrassons</i>	<i>41</i>
4.1.2. <i>Avaliação do potencial de produção de diferentes espécies</i>	<i>42</i>
4.1.3. <i>Estudo do melhor sistema de solventes</i>	<i>43</i>
4.1.4. <i>Redução do tempo de utilização do banho de ultrassons.....</i>	<i>45</i>
4.2. <i>Produção de Biodiesel – Transesterificação Catalítica</i>	<i>46</i>
5. Conclusão e Trabalhos Futuros	49
Referências Bibliográficas.....	51

Índice de figuras

Figura 1: Consumo de Energia Final por Tipo de Setor na EU-28 [3]	1
Figura 2: Consumo de Energia Final por Modo de Transporte na EU-28 [3]	2
Figura 3: Consumo de Energia Final por Tipo de Combustível na EU-28 [3]	2
Figura 4: Produção de Biocombustíveis na EU-28 [3]	3
Figura 5: Evolução do Balanço Energético em Portugal [7]	4
Figura 6: Consumo de Energia Primária por Fonte Energética em Portugal [7]	4
Figura 7: Dependência Energética em Portugal [7]	5
Figura 8: Consumo de Energia Final por modo de Transporte em Portugal [3]	6
Figura 9: Incorporação de Biodiesel no Gasóleo Rodoviário [11]	6
Figura 10: Caracterização dos Biocombustíveis (adaptado de [13])	8
Figura 11: Reação de Transesterificação (adaptado de [15])	9
Figura 12: Reação de Hidrólise (adaptado de [65])	9
Figura 13: Reação de Esterificação (adaptado de [65])	9
Figura 14: Variação média das emissões de poluentes em função da % de Biodiesel (adaptado de [20])	12
Figura 15: Método de produção convencional do biodiesel a partir de microalgas (adaptado de [25])	16
Figura 16: Desenho Esquemático dos três sistemas de cultivo de biomassa microalgal: (A) Lagoa Aberta (ORP); (B) Fotobiorreator tubular horizontal; (C) Fotobiorreator de placa plana (adaptado de [32])	20
Figura 17: Diagrama das Técnicas de Colheita e Secagem de Microalgas (adaptado de [34])	22
Figura 18: Classificação dos métodos de extração lipídica (adaptado de [42])	25
Figura 19: Processo de rotura celular usando vários métodos de tratamento: (a) Sem tratamento, (b) Calor, (c) ultrassons e (d) micro-ondas (adaptado de [45])	26
Figura 20: Diferentes processos de conversão de óleo de microalgas (adaptado de [53]) ..	29
Figura 21: Representação esquemática de um processo de transesterificação direta (adaptado de [63])	31
Figura 22: Procedimento base aplicado ao processo de extração lipídica	33
Figura 23: Variações aplicadas à etapa 1 e 2 do modelo de extração lipídica	34
Figura 24: Variações aplicadas à etapa 3 do modelo de extração lipídica	34
Figura 25: Procedimento utilizado no processo de conversão do conteúdo lipídico em biodiesel	35

Figura 26: Biomassa microalgal seca pulverizada: <i>Scenedesmus</i> sp. (esquerda) e <i>Nannochloropsis gaditana</i> (direita)	35
Figura 27: Banho de ultrassons	37
Figura 28: Diferentes Fases verificadas na ampola de decantação	39
Figura 29: Eficiência de extração com e sem a aplicação do banho de ultrassons à espécie <i>Nannochloropsis gaditana</i>	42
Figura 30: Avaliação do potencial de produção de diferentes espécies.....	43
Figura 31: Eficiência de extração de diversos sistemas de solventes	44
Figura 32: Extração com n-hexano, metanol e diclorometano/metanol para vários tempos de operação	46

Índice de Quadros

Quadro 1: Propriedades técnicas do biodiesel para comercialização (adaptado de [19])...	11
Quadro 2: Comparação entre diferentes fontes de Biodiesel (adaptado de [21])	13
Quadro 3: Conteúdo Lipídico e Produtividade de diferentes espécies de microalgas (adaptado de [21])	14
Quadro 4: Comparação de Parâmetros entre tanque aberto e fotobiorreator (adaptado de [1])	21
Quadro 5: Comparação entre vários métodos de colheita de microalgas (adaptado de [37 - 41])	24
Quadro 6: Processo de rotura celular e consumos de energia associados.....	27
Quadro 7: Otimização de diferentes sistemas de solventes (adaptado de [51])	28
Quadro 8: Diferentes métodos de transesterificação Catalítica	30
Quadro 9: Lista de reagentes, respetivas purezas e marcas	36
Quadro 10: Lista de materiais, equipamentos e respetivas marcas	36
Quadro 12: Resultado obtido no processo de produção de biodiesel	47

Lista de Abreviaturas

CFE – *Super Critical Fluid Extraction*

DME – Dimetil Éter

EU – *European Union*

FAME – *Fatty Acids Methyl Esters*

FER – Fontes de Energia Renováveis

FTL – *Fisher Tropsch*

GEE – Gases com Efeito de Estufa

HC – Hydrodynamic Cavitation

NKP – Azoto, Potássio, Fósforo

ORP - *Oxidation-Reduction Potential*

PBR – *Photobioreactors*

PETI+3 – Plano Estratégico dos Transportes e Infraestruturas

PNAEE – Plano Nacional de Ação para a Eficiência Energética

SCM – *Supercritical Methanol*

SFE –*Supercritical Fluid Extraction*

SNG - *Synthetic Natural Gas*

SST – Sólidos Suspensos Totais

TAG –*Triacylglycerols*

1. Introdução

A crescente evolução da sociedade tem vindo a acentuar cada vez mais a procura de soluções energéticas e tecnológicas para satisfazer as necessidades de cada nação e de cada indivíduo, nomeadamente do consumo constante de combustíveis de origem fóssil e, em particular, no setor dos transportes [1].

A procura de recursos limpos que permitam assegurar as necessidades energéticas futuras constitui um dos maiores desafios do Homem na atualidade. O aumento do consumo de combustíveis, bem como o impacto ambiental associado à emissão de gases com efeito de estufa (GEE) criou a necessidade do desenvolvimento de tecnologias renováveis alternativas que suportem a indústria e as necessidades do mercado mundial [2].

1.1. Panorama Energético na Europa e em Portugal

O consumo de energia final verificado na EU-28 dos diferentes setores sofreu algumas oscilações entre os anos 2003 e 2013. Em 2013 o consumo de energia final na EU-28 atingiu um valor de 1 104 milhões de tep, sendo o setor dos transportes o que apresenta um consumo superior, com um valor na ordem dos 31% (Figura 1).

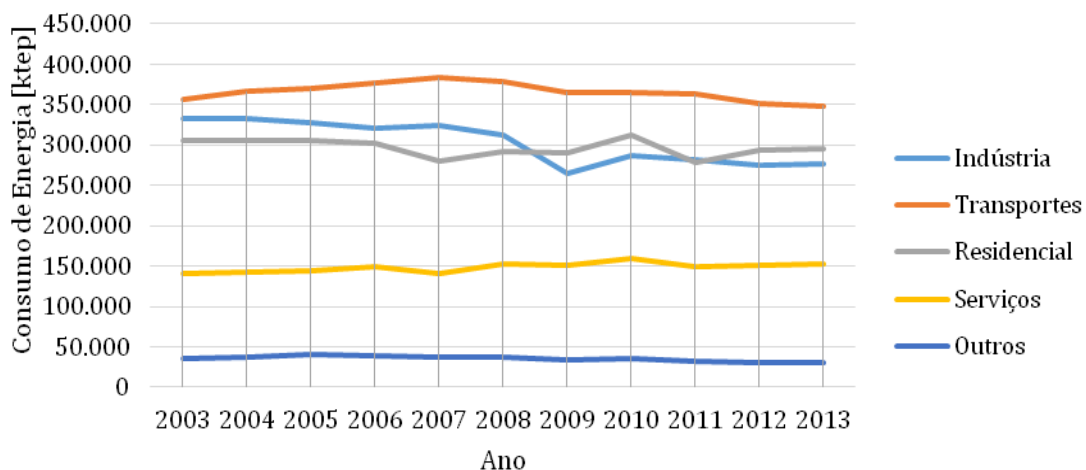


Figura 1: Consumo de Energia Final por Tipo de Setor na EU-28 [3]

Dentro do setor dos transportes, o que apresenta a taxa mais significativa de consumo é o modo rodoviário, que em 2013 atingiu um valor de 285 milhões de tep, isto é, 82% dos 348 milhões de tep consumidos por este setor (Figura 2).

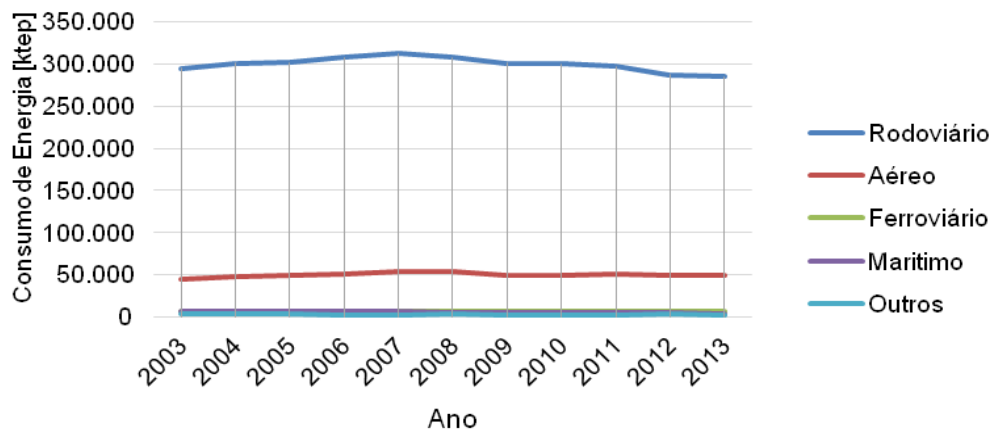


Figura 2: Consumo de Energia Final por Modo de Transporte na EU-28 [3]

Na última década verificaram-se também algumas mudanças nos combustíveis consumidos no setor dos transportes. Verificou-se até 2013 um aumento gradual do consumo de gásóleo/gás, totalizando nesse ano um valor de 57% do consumo total associado aos combustíveis. Relativamente à gasolina, registou-se uma redução contínua de 37% em 2003 para 24% em 2013. O crescimento dos biocombustíveis foi mais evidente a partir de 2004 (Figura 3), sendo uma das principais razões para este facto a implementação da Diretiva 2003/30/CE, cujo objetivo visava promover a utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes [4]. A Diretiva 2009/28/CE revoga e altera a antecedente, estabelecendo metas com objetivos nacionais obrigatórios coerentes com uma quota de 20% energia proveniente de fontes renováveis e uma quota de 10% de energia proveniente de fontes renováveis no setor dos transportes no consumo energético da Comunidade, a atingir até 2020. [5].

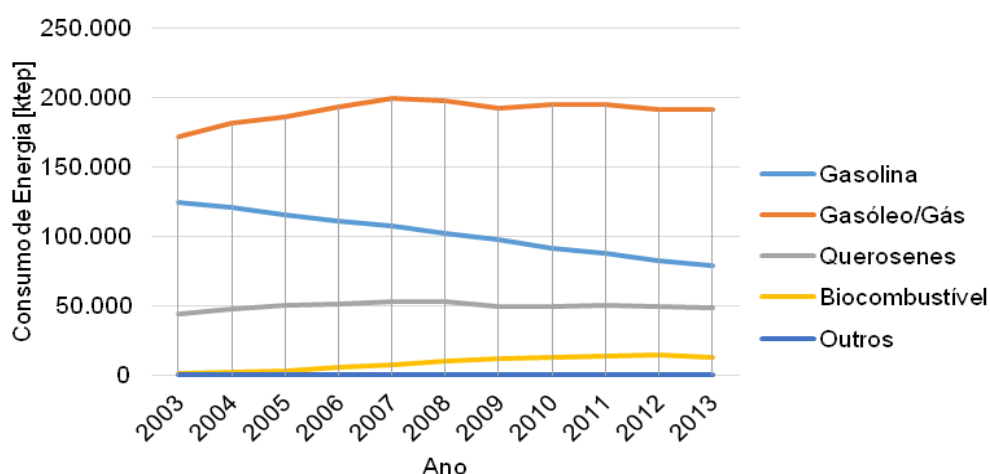


Figura 3: Consumo de Energia Final por Tipo de Combustível na EU-28 [3]

Em 2013 verificou-se que a produção de biocombustíveis apresentou um valor aproximadamente 10 vezes superior ao antecedente de 2003, tendo o biodiesel o crescimento mais acentuado, de tal forma que em 2013 a sua produção representou 79% do total da produção de biocombustíveis (Figura 4).

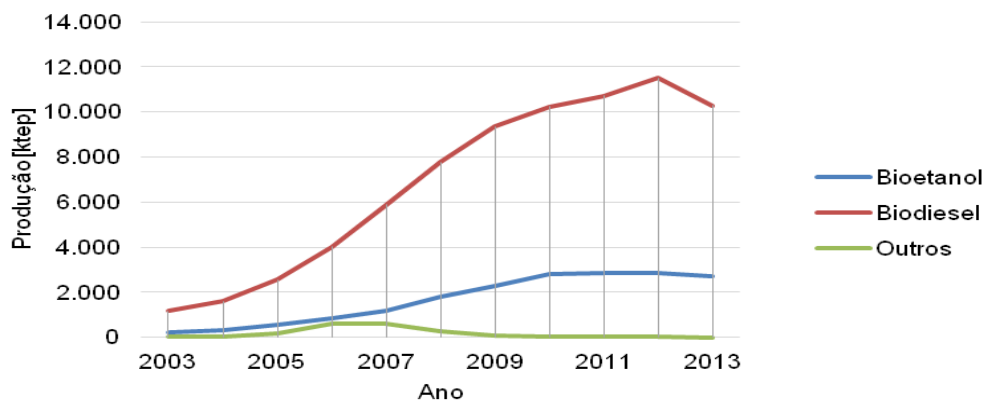


Figura 4: Produção de Biocombustíveis na EU-28 [3]

O Pacote “Energia-Clima” (ou Pacote “20-20-20”), adotado em dezembro de 2008 pela EU, estabeleceu para 2020 a redução de 20% do consumo de energia primária, relativamente aos níveis de 1990. Em outubro de 2014, no âmbito do quadro de ação da EU relativo ao clima e à energia para 2030, foi estabelecida a meta não vinculada de redução do consumo de energia de pelo menos 27% em relação às projeções do consumo futuro de energia com base nos critérios atuais.

Em Portugal, e para 2016, o Plano Nacional de Ação para Eficiência Energética para o período 2013-2016 (PNAEE) estima uma redução do consumo energético de aproximadamente 8,2% relativamente à média do consumo final de energia verificada no período entre 2001 e 2005, o que se aproxima da meta definida pela EU de 9% de poupança de energia até 2016 (Diretiva 2006/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 5 de abril) [6].

Analisando o balanço energético nacional (Figura 5), continua a evidenciar-se um grande peso das importações de energia, que representam um valor quatro vezes superior ao da produção doméstica, apesar desta última ter aumentado 14% em 2013 face ao verificado em 2012, devendo-se sobretudo ao aumento da produção de energia hídrica e energia eólica.

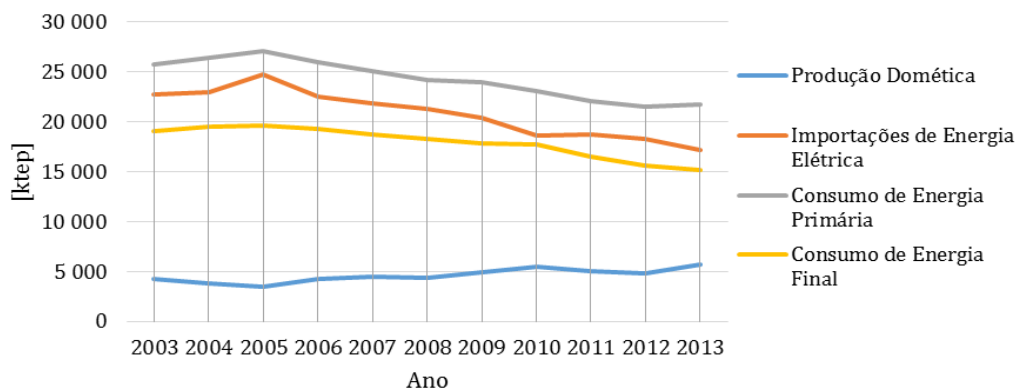


Figura 5: Evolução do Balanço Energético em Portugal [7]

No que diz respeito ao tipo de fonte energética utilizada no consumo de energia primária, constatou-se que o petróleo e os seus derivados têm sido a fonte energética mais utilizada ao longo dos anos, embora o seu peso relativo tenha vindo a diminuir, passando de 59% do consumo de energia primária em 2003 para 45% em 2013. Nesse ano, a segunda fonte energética mais utilizada foi as renováveis (25%), seguindo-se o gás natural (17%), e o carvão (12%) (Figura 6).

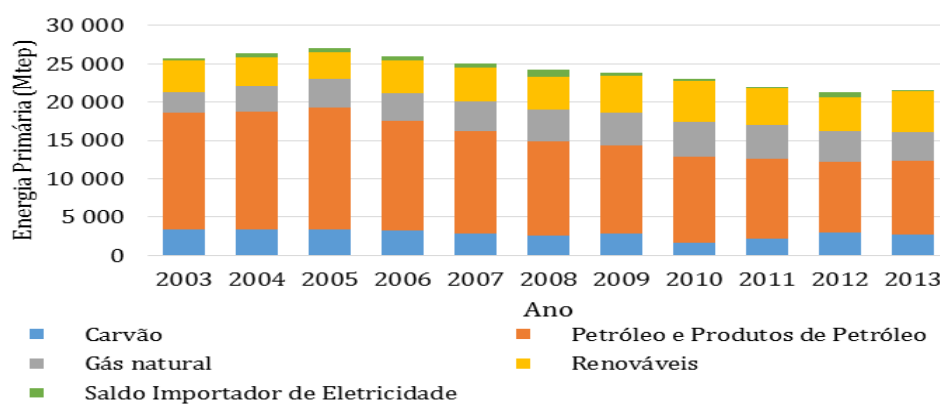


Figura 6: Consumo de Energia Primária por Fonte Energética em Portugal [7]

Relativamente ao consumo de energia por setor de atividade, em Portugal constatou-se que em 2013, o setor dos transportes e o setor da indústria foram os maiores consumidores de energia final, representado 36% e 32%, respetivamente.

Em 2013, a dependência energética do exterior alcançou o valor mais baixo das duas últimas décadas, 73,90%, o que traduz uma descida de 5,5% face ao ano de 2012, (Figura 7), devido sobretudo à redução do consumo de carvão e gás natural e simultânea subida da produção doméstica.

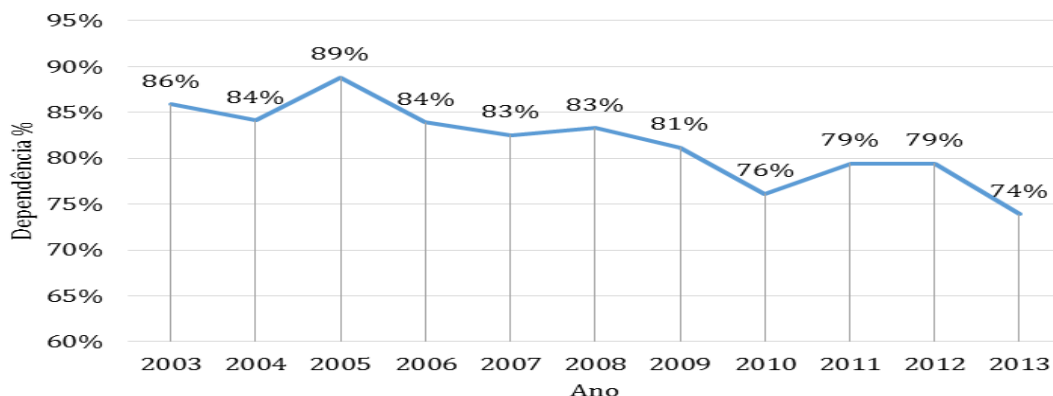


Figura 7: Dependência Energética em Portugal [7]

O setor dos transportes mantém-se como um dos setores de atividade com maior consumo de energia, sendo clara a necessidade de promover uma mudança do paradigma energético que reduza profundamente a dependência dos combustíveis fósseis e garanta uma drástica redução das emissões de GEE. O Plano Estratégico dos Transportes e Infraestruturas 2014-2020 (PETI3+), divulgado em abril de 2014, estabelece três objetivos estratégicos [8]:

- Contribuir para o crescimento económico, apoiando as empresas portuguesas e a criação de emprego;
- Assegurar a competitividade do setor dos transportes e a sua sustentabilidade financeira para os contribuintes portugueses;
- Promover a coesão social e territorial, assegurando a mobilidade de pessoas e bens, em todo o país.

O Decreto-Lei nº 117/2010 de 25 de outubro estabelece os limites de incorporação obrigatória de biocombustíveis (2011 a 2020) em teor energético:

- a) 2011-2012: 5%
- b) 2013-2014: 5,5%
- c) 2015-2016: 7,5%
- d) 2017-2018: 9%
- e) 2019-2020: 10%

Estabeleceu também, sem prejuízo, a incorporação obrigatória mínima do biodiesel no gasóleo rodoviário, em volume, para 2011 a 2014, em 6,75%.

Tal como na Europa, também em Portugal o modo de transporte rodoviário domina em termos de consumos energéticos, representando, em 2013, 80% do consumo total. (Figura 8).

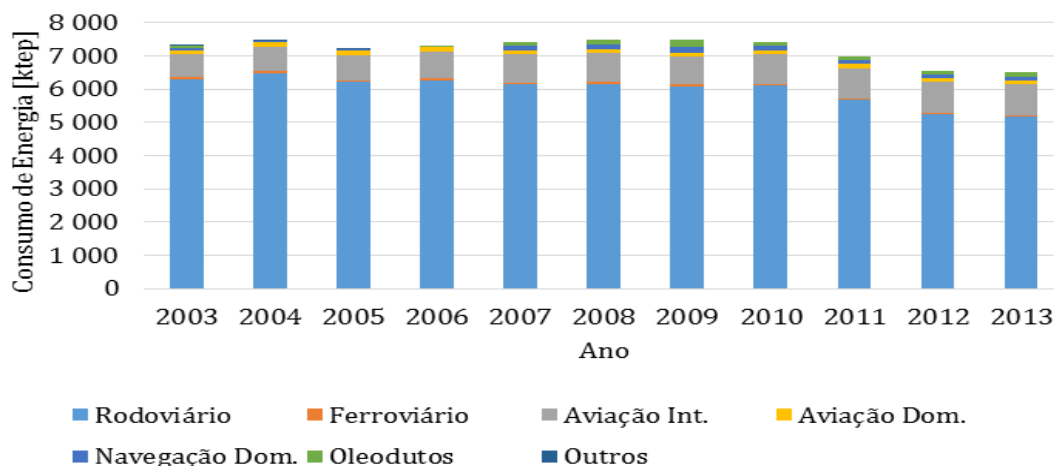


Figura 8: Consumo de Energia Final por modo de Transporte em Portugal [3]

Em 2013 os combustíveis que tiveram maior representação nos meios de transporte foram o gasóleo e a gasolina. Todavia, no período de 2003 a 2013, verificou-se uma redução no consumo de gasolina e um aumento do consumo de gasóleo devido sobretudo ao agravamento dos preços do barril de petróleo, levando os consumidores a optarem por veículos a gasóleo que têm um consumo mais económico.

A introdução de biocombustíveis no setor dos transportes em Portugal teve início em 2004, mas com valores muito baixos, começando a ter alguma evidência apenas a partir de 2005. Em 2013 o biodiesel representou 97% do consumo total de biocombustíveis, a sua incorporação em veículos rodoviários foi estabelecida segundo o Decreto-lei nº 49/2009, obrigando a incorporação de 6% (v/v) de biodiesel em gasóleo rodoviário em 2009 e 10% (v/v) no ano de 2010 [10]. No entanto, verificou-se uma incorporação de apenas 4% (Figura 9), ficando aquém do estabelecido, tendo continuado a existir um decréscimo nos últimos anos, provavelmente devido às metas implementadas pelo Governo Português que vieram a desacelerar o crescimento do setor.

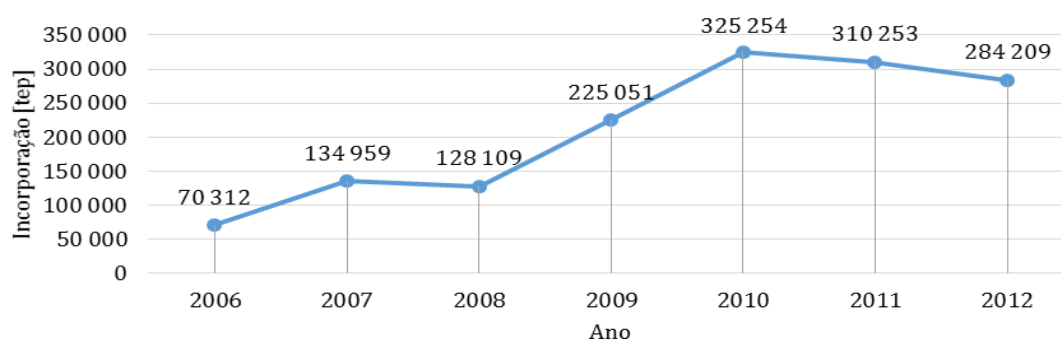


Figura 9: Incorporação de Biodiesel no Gasóleo Rodoviário [11]

1.2. Biocombustíveis

Os biocombustíveis são um conjunto de combustíveis derivados de vários tipos de biomassa e podem ser produzidos através de várias tecnologias de conversão. Estes combustíveis podem ser álcoois (como o etanol, metanol ou butanol), hidrocarbonetos (semelhantes à gasolina, gasóleo, e combustível de aviação), hidrogénio (H_2) e gás natural sintético (SNG) [12].

Os biocombustíveis podem ser classificados como primários e secundários. Os biocombustíveis primários são utilizados em sistemas de aquecimento, cozedura, ou até mesmo na produção de energia elétrica, são exemplos a lenha, cavacos de madeira, *pellets*, etc. Os biocombustíveis secundários requerem um processamento específico podendo ser utilizados em veículos e diversos processos industriais (são exemplos o etanol e o biodiesel). Os biocombustíveis secundários são classificados em biocombustíveis de primeira, segunda e terceira geração com base na matéria-prima e tecnologia utilizada na sua produção [13].

Nos biocombustíveis de primeira geração, a matéria-prima provém, principalmente, de culturas alimentares. É utilizado o processo de fermentação da cana-de-açúcar, milho, entre outras, se o objetivo for a produção de bioetanol. Se a matéria-prima for proveniente de culturas oleaginosas é aplicado o processo de transesterificação (o mais aplicado industrialmente) para a obtenção de biodiesel, caso dos óleos de palma, girassol, amendoim, entre outras culturas oleaginosas [2].

A produção de biocombustíveis de primeira geração ocorre, em diversos países, em quantidades bastantes significativas, no entanto a sua viabilidade continua a ser questionável devido, principalmente, à competição existente com culturas alimentares para os mesmos solos. Estes fatores acabaram por impor limites na produção de combustíveis de primeira geração, que hoje em dia atinge os cerca de 50 mil milhões de litros por ano, com as consequências que daí advêm. Assim, sendo, e para que haja uma melhoria efetiva no desempenho ambiental e económico é aconselhável o uso de novas alternativas mais eficientes baseadas tanto em matérias-primas renováveis, como no uso e desenvolvimento de novas tecnologias [13].

Os biocombustíveis de segunda geração surgiram para fazer face a algumas das desvantagens dos biocombustíveis de primeira geração, uma vez que usam matéria-prima não alimentar, que pode ser considerada como resíduo, ou proveniente de solos menos apropriados para a agricultura, não competindo assim com o setor alimentar. Este tipo de biocombustível pode ser classificado de acordo com o método ou processo utilizado para

converter a biomassa em combustível, isto é, bioquímico ou termoquímico [13]. Segundo a literatura é evidente que os biocombustíveis de segunda geração requerem equipamentos de produção mais sofisticados, levando a mais investimento por unidade de produção, tornando-se numa barreira que necessita ser ultrapassada [13].

A 3ª geração de biocombustíveis deixa de lado os substratos agrícolas e óleos vegetais e dirige a sua atenção para os microrganismos. Portanto, com base na corrente de conhecimento científico e projeções tecnológicas, os biocombustíveis de terceira geração, especificamente derivados de micróbios e microalgas são considerados uma fonte de energia alternativa viável desprovida dos inconvenientes apresentados pelos biocombustíveis de primeira e segunda geração [13].

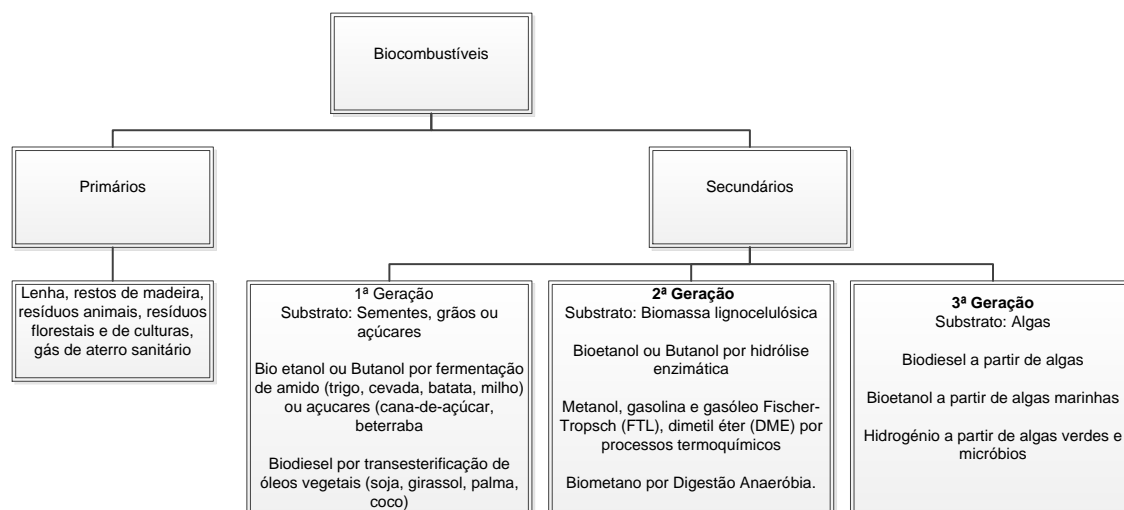


Figura 10: Caracterização dos Biocombustíveis (adaptado de [13])

1.3. Biodiesel

Segundo a Diretiva 2003/30/CE o biodiesel é definido como sendo um “éster metílico produzido a partir de óleos vegetais ou animais, com qualidade de combustível para motores *diesel*, para utilização como biocombustível” [4]. O biodiesel pode ser produzido através de um processo designado de transesterificação ou através da esterificação.

No processo de transesterificação (Figura 11), ocorre a reação de um triglicerídeo, principal constituinte dos óleos e gorduras, com um álcool, que na presença de um catalisador, origina glicerol e biodiesel [14].

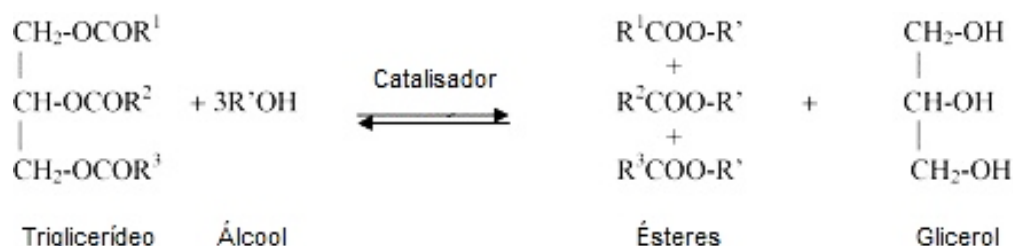


Figura 11: Reação de Transesterificação (adaptado de [15])

No fim do processo ocorre a separação das fases, pois o glicerol é imiscível no biodiesel, permitindo assim a sua remoção para utilização noutras aplicações, e o biodiesel para utilização como substituto ou aditivo do gasóleo.

A esterificação é uma reação química reversível no qual um ácido carboxílico reage com um álcool produzindo éster e água. Este processo é uma alternativa ao processo de transesterificação, pois favorece a utilização de matérias-primas (óleos de plantas oleaginosas, resíduos gordurosos industriais, e óleos de frituras) de qualquer teor de ácidos gordos e humidade, uma vez que todos os triglicerídeos presente no óleo serão transformados por hidrólise, Figura 12. Esta reação pode ocorrer na presença de catalisadores ácidos ou básicos [66].

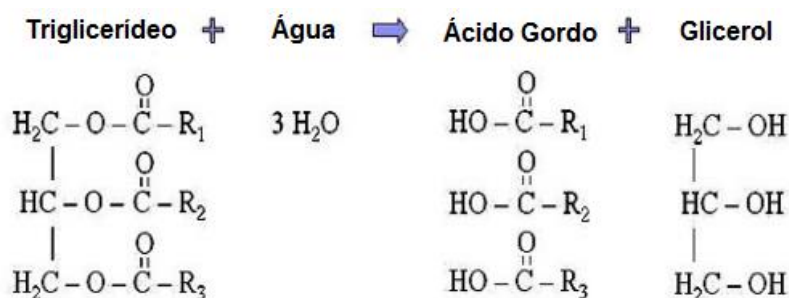


Figura 12: Reação de Hidrólise (adaptado de [66])

Após a hidrólise, os ácidos gordos gerados, podem ser esterificados com metanol ou etanol, obtendo-se o “metil” ou “etil” éster com elevada pureza. O glicerol não sofre qualquer alteração por parte da interação com o metanol ou com o biodiesel, uma vez que é removido no final do processo de hidrólise. A esterificação produz então o biodiesel e água como subproduto, Figura 13.

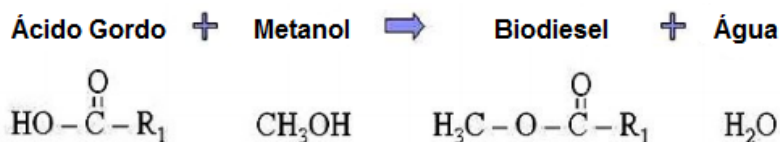


Figura 13: Reação de Esterificação (adaptado de [66])

O biodiesel pode ser usado puro ou misturado com o gasóleo em diferentes proporções, sem que isso cause qualquer tipo de prejuízo ou perda de desempenho ao motor. De modo

a identificar a proporção da mistura de biodiesel ao gasóleo, convencionou-se, a nível mundial, que a concentração de biodiesel é informada através de uma nomenclatura específica, definida como B_x , onde x corresponde à percentagem em volume do biodiesel. Deste modo e como exemplo, cita-se o termo B_{20} (do inglês *Blend 20%*), a mistura mais comum, que significa que uma mistura é constituída por 20% (v/v) de biodiesel e 80% (v/v) de gasóleo. Assim, B_{100} refere-se ao biodiesel puro. As misturas mais comuns no mercado mundial variam entre B_2 e B_{20} [16].

O biodiesel tem vindo a ser cada vez mais encarado como uma ferramenta de redução de CO_2 , tem vindo a assumir uma importância crescente na promoção da sustentabilidade em Portugal e no restante espaço comunitário. Para além de contribuir para uma mobilidade mais sustentável, a sua introdução no setor dos transportes poderá trazer inúmeras vantagens [16-18]:

- O biodiesel apresenta um teor médio de oxigénio que varia entre 10-11%, o que o torna um combustível com boas características de combustão;
- Combustível miscível com o gasóleo, podendo ser utilizado em várias proporções dependendo do tipo de motor;
- Elevado número de cetanos (> 50), assim, a combustão é mais completa diminuindo as emissões de gases nocivos à saúde (melhoria do desempenho da ignição);
- Capacidade lubrificante superior ao gasóleo, o que aumenta a vida útil dos motores;
- Fácil transporte e armazenamento, dado que possui um ponto de ignição superior ao do gasóleo;
- Não tóxico, biodegradável (uma mistura de 20% de biodiesel com gasóleo degrada-se duas vezes mais rápido que o gasóleo) e renovável, pois as terras cultiváveis podem produzir uma enorme variedade de oleaginosas como fonte de matéria-prima;
- Emissões de gases livres de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (potencialmente cancerígenos);
- Libertação de gases de combustão isentos de óxidos de enxofre (SO_x), principais causadores das chuvas ácidas, quando produzidos a partir de matéria-prima vegetal;
- O glicerol, subproduto obtido a partir do processo de transesterificação, pode ser utilizado para fins farmacêuticos e indústria química;

Enquanto biocombustível o biodiesel também apresenta algumas desvantagens relativamente ao gasóleo [16-18]:

- O biodiesel apresenta um poder calorífico 12% mais baixo que o gasóleo, o que se traduz num aumento do consumo de combustível de cerca de 2-10%;
- O biodiesel provoca polimerização e depósitos de carbono no motor, provocando desta forma a contaminação do óleo que fica com problemas de fluxo;
- Apresenta uma viscosidade relativamente mais elevada e menor volatilidade, e portanto, necessita de maior pressão no injetor;
- Devido ao elevado teor de oxigénio no biodiesel, existe uma superior concentração de emissões de NO_x, 10-14% durante o processo de combustão;
- Incompatibilidade com alguns materiais, promovendo a corrosão de componentes de borracha (necessário substituir elastómeros e outros materiais das juntas) e ocasionar a dissolução da pintura do veículo (necessário usar tintas resistentes) e do asfalto;
- Ponto de solidificação entre 0-5°C, podendo ocorrer problemas na passagem do biodiesel para o motor;
- A produção a grande escala de biodiesel a partir de óleos alimentares pode provocar um desequilíbrio global no mercado de oferta e procura de alimentos;
- O processo de transesterificação é caro (aumento dos custos do combustível).

Apesar de não serem necessárias alterações na tecnologia (peças e componentes), o biodiesel tem que apresentar uma qualidade definida, segundo a norma EN 14214:2008 para os vários parâmetros (Quadro 1), de forma a vir a ser comercializado como biocombustível [19].

Quadro 1: Propriedades técnicas do biodiesel para comercialização (adaptado de [19])

<i>Propriedades</i>	<i>Unidades</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
<i>Teor de éster</i>	% (m/m)	96,5	-
<i>Massa Volúmica a 15°C</i>	(g/mL)	0,86	0,90
<i>Viscosidade a 40°C</i>	(mm ² /s)	3,50	5,00
<i>Ponto de inflamação</i>	(°C)	101	-
<i>Teor de enxofre</i>	(mg/kg)	-	10,0
<i>Número de Cetanos</i>	-	51,0	-
<i>Cinzas Sulfatadas</i>	% (m/m)	-	0,02
<i>Teor de água</i>	% (mg/kg)	-	500
<i>Contaminação Total</i>	(mg/kg)	-	24
<i>Corrosão à Lâmina de Cobre (3h a 50°C)</i>	-	Classe 1	
<i>Estabilidade à oxidação, 110°C (h)</i>	(h)	8	-
<i>Índice de Acidez</i>	(mg KOH/g)	-	0,50
<i>Índice de Iodo</i>	(g iodo/100g)	-	120
<i>Éster metílico do ácido linolénico</i>	% (m/m)	-	12,0
<i>Ésteres Metílicos polinsaturados</i>	% (m/m)	-	1

<i>Propriedades</i>	<i>Unidades</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
<i>Metanol</i>	% (m/m)	-	0,20
<i>Monoglicerídeos</i>	% (m/m)	-	0,70
<i>Diglicerídeos</i>	% (m/m)	-	0,20
<i>Triglicerídeos</i>	% (m/m)	-	0,20
<i>Glicerol Livre</i>	% (m/m)	-	0,02
<i>Glicerol Total</i>	% (m/m)	-	0,25
<i>Metais do Grupo I (Na+k)</i>	(mg/kg)	-	5,0
<i>Fósforo</i>	(mg/kg)	-	2,0

Os impactos das emissões constituem um pilar fundamental para a preservação ambiental, nesse sentido, a redução das emissões das partículas e dos hidrocarbonetos não queimados apresenta-se como uma grande vantagem. Efetivamente, e como se percebe pela Figura 14, só no caso do NO_x é que essa situação não se verifica, uma vez que o biodiesel reduz todos os outros poluentes (CO , SO_2 , HC e PM) [20].

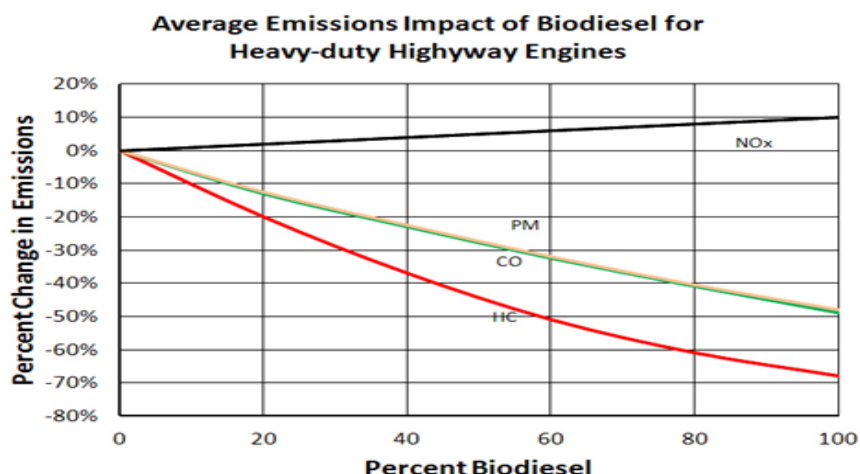


Figura 14: Variação média das emissões de poluentes em função da % de Biodiesel (adaptado de [20])

Entre as diversas possibilidades existentes para obtenção de biodiesel, destacam-se as microalgas como sendo a matéria-prima de mais forte interesse a ser investigada e implementada a uma escala piloto bem como a uma escala industrial. Existe uma larga variedade de questões relacionadas com a sua produção e processamento que requerem uma análise bem detalhada, pois a produção de microalgas não está apenas relacionada com a produção de biocombustíveis, mas também com a possibilidade de combinação com o controlo de poluição, em particular com a diminuição das emissões de CO_2 e outros gases com efeito de estufa, ou tratamento de águas residuais [21].

1.4. Microalgas para produção de Biodiesel

O interesse no potencial biotecnológico das microalgas tem aumentado nos últimos anos atendendo à sua grande biodiversidade e às numerosas substâncias que podem sintetizar. O desenvolvimento de tecnologias de cultivo, de colheita e de processamento da biomassa microalgal, em grande escala, tem permitido que determinadas espécies sejam já utilizadas comercialmente. De entre os inúmeros compostos extraídos com potencial para exploração comercial, encontra-se o óleo para biodiesel como fonte alternativa de combustível aplicável no setor nos transportes.

As microalgas têm sido propostas como uma potencial fonte de combustível renovável, têm a capacidade de gerar quantidades significativas de biomassa e de óleo, passíveis de serem convertidos em biodiesel e outros biocombustíveis. O Quadro 2 compara diferentes matérias-primas para a produção de biodiesel [21].

Quadro 2: Comparação entre diferentes fontes de Biodiesel (adaptado de [21])

<i>Matéria-prima</i>	<i>Conteúdo Oleico (% de óleo/peso de biomassa)</i>	<i>Rendimento Oleico (L/ha.ano)</i>	<i>Utilização de Terreno (m².ano/kg biodiesel)</i>	<i>Produtividade de Biodiesel (kg/ha.ano)</i>
<i>Milho</i>	44	172	66	152
<i>Soja</i>	18	636	18	562
<i>Jatropha</i>	28	741	15	656
<i>Canola</i>	41	974	12	862
<i>Girassol</i>	40	1 070	11	946
<i>Palma</i>	36	5 366	2	4 747
<i>Microalga (baixo conteúdo oleico)</i>	30	587	0.2	51 927
<i>Microalga (médio conteúdo oleico)</i>	50	978	0.1	86 515
<i>Microalga (alto conteúdo oleico)</i>	70	1 369	0.1	121 104

Embora o conteúdo oleico seja similar entre as diversas matérias-primas, as microalgas apresentam um valor superior no que diz respeito à produtividade de biodiesel. Por exemplo, o milho, cujo conteúdo oleico é de cerca de 44% de óleo/peso de biomassa é capaz de produzir 152 kg de biodiesel/ha.ano, enquanto uma espécie de microalga que apresente apenas 30% de óleo/peso de biomassa é capaz de conseguir uma produção de biodiesel na ordem dos 51 927 kg/ha.ano. Relativamente à utilização de terreno, as microalgas apresentam uma necessidade de ocupação de solo bastante reduzida, ao contrário do milho e da soja que necessitam de grandes áreas de terreno para o seu cultivo [21].

Para além destas particularidades, as microalgas apresentam outras características aquando da sua utilização como fonte de biocombustível [22-23].

- Podem ser utilizadas em terrenos impróprios para a agricultura convencional;
- Apresentam um conteúdo lipídico na ordem dos 20-50 % em base seca, podendo em condições ideais atingir os 85 %. As microalgas mais comuns podem duplicar a sua biomassa em menos de 24 h devido, principalmente, à sua elevada eficiência fotossintética [23];
- Devido à diminuta necessidade de terreno as microalgas não competem com as culturas alimentares, podem ser cultivadas em água salgada, salobra e residual de qualidade marginal;
- O rendimento oleico por área de cultura excede em muito o rendimento das melhores oleaginosas;
- Podem utilizar azoto e fósforo proveniente de uma variedade de fontes de águas residuais;
- Elevada eficiência de remoção de CO₂ da atmosfera, podendo atingir uma taxa de remoção na ordem dos 1,8 kg CO₂/kg biomassa [23];
- Podem utilizar gases de escape de instalações industriais ou gases produzidos na fermentação aeróbia.

Relativamente aos inconvenientes apresentados pela produção de biodiesel a partir de microalgas, estes estão mais relacionados com processo de conversão, onde existe um elevado custo de capital, um elevado dispêndio energético em todas as fases de processamento e um elevado consumo de reagentes nas etapas de extração e transesterificação [24]. Por outro lado, e analisando o processo de cultivo, quando aplicado a larga escala, poderão existir problemas no controlo das condições de cultura [24].

Existe uma variedade de espécies de microalgas, podendo algumas ser induzidas a acumular quantidades consideráveis de lípidos, contribuindo assim para um elevado rendimento oleico. O teor médio de lípidos pode variar entre 1 e 70 %, mas algumas espécies sob condições extremas podem atingir rendimentos na ordem do 90 % em base seca [21]. O Quadro 3 apresenta o conteúdo lipídico e a produtividade para diferentes espécies de microalgas marinhas e de água doce.

Quadro 3: Conteúdo Lipídico e Produtividade de diferentes espécies de microalgas (adaptado de [21])

<i>Espécie de Microalga</i>	<i>Conteúdo Lipídico (% peso de biomassa seca)</i>	<i>Produtividade lipídica (mg/L.dia)</i>
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24.0-31.0	-
<i>Botryococcus braunii</i>	25.0-75.0	-

<i>Espécie de Microalga</i>	<i>Conteúdo Lipídico (% peso de biomassa seca)</i>	<i>Produtividade lipídica (mg/L.dia)</i>
<i>Chaetoceros muelleris</i>	33.6	21.8
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14.6-16.4/39.8	17.6
<i>Chlorella emersonii</i>	25.0-63.0	10.3-50.0
<i>Chlorella protothecoides</i>	14.6-57.8	1214
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19.0-22.0	44.7
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0-58.0	11.2-40.0
<i>Chlorella sp.</i>	10.0-48.0	42.1
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2.0	-
<i>Chlorella</i>	18.0-5.0	18.7
<i>Chlorococcum sp.</i>	19.3	53.7
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20.0-51.1	-
<i>Dunaliella salina</i>	6.0-25.0	116.0
<i>Dunaliella primolecta</i>	23.1	-
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16.7-71.0	-
<i>Dunaliella sp.</i>	17.5-67.0	33.5
<i>Ellipsoidion sp.</i>	27.4	47.3
<i>Euglena gracilis</i>	14.0-20.0	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25.0	-
<i>Isochrysis galbana</i>	7.0-40.0	-
<i>Isochrysis sp.</i>	7.1-33	37.8
<i>Monodus subterraneus</i>	16.0	30.4
<i>Monallanthus salina</i>	20.0-22.0	-
<i>Nannochloris sp.</i>	20.0-56.0	60.9-76.5
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22.7-29.7	84.0-142.0
<i>Nannochloropsis sp.</i>	12.0-53.0	37.6-90.0
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29.0-65.0	90.0-134.0
<i>Nitzschia sp.</i>	16.0-47.0	-
<i>Oocystis pusilla</i>	10.5	-
<i>Pavlova salina</i>	30.9	49.4
<i>Pavlova lutheri</i>	35.5	40.2
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18.0-57.0	44.8
<i>Porphyridium cruentum</i>	9.0-18.8/60.7	34.8
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11.0-55.0	-
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1.9-18.4	35.1
<i>Scenedesmus sp.</i>	19.6-21.1	40.8-53.9
<i>Skeletonema sp.</i>	13.3-31.8	27.3
<i>Skeletonema costatum</i>	13.5-51.3	17.4
<i>Spirulina platensis</i>	4.0-16.6	-
<i>Spirulina maxima</i>	4.0-9.0	-
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20.6	17.4
<i>Tetraselmis suecica</i>	8.5-23.0	27.0-36.4
<i>Scenedesmus sp.</i>	12.6-14.7	43.4

Como se pode verificar pela análise do Quadro 3, o conteúdo lipídico de algumas microalgas pode chegar aos 75 % em base seca, como é o caso da espécie *Botryococcus braunii* no, entanto a sua produtividade para produção de biodiesel é praticamente nula. Para o estudo em questão é importante que as microalgas apresentem elevada produtividade lipídica de forma a se conseguir obter o melhor rendimento possível para a produção de biodiesel. Entretanto não basta ter uma elevada capacidade de produção, é necessário ter em consideração outros fatores, como a capacidade do desenvolvimento das microalgas perante os nutrientes disponíveis, ou as condições ambientais específicas. Todos estes parâmetros devem ser considerados aquando da seleção de espécies mais adequadas para a produção de biodiesel.

Atualmente, apesar de toda a investigação realizada nas últimas décadas, com o objetivo de utilizar algas como matéria-prima para a produção de biodiesel, ainda não existe nenhum método de produção estabelecido à escala industrial para fins comerciais. O processo de produção mais convencional utilizado hoje em dia a nível laboratorial pode ser descrito através do seguinte esquema [25].

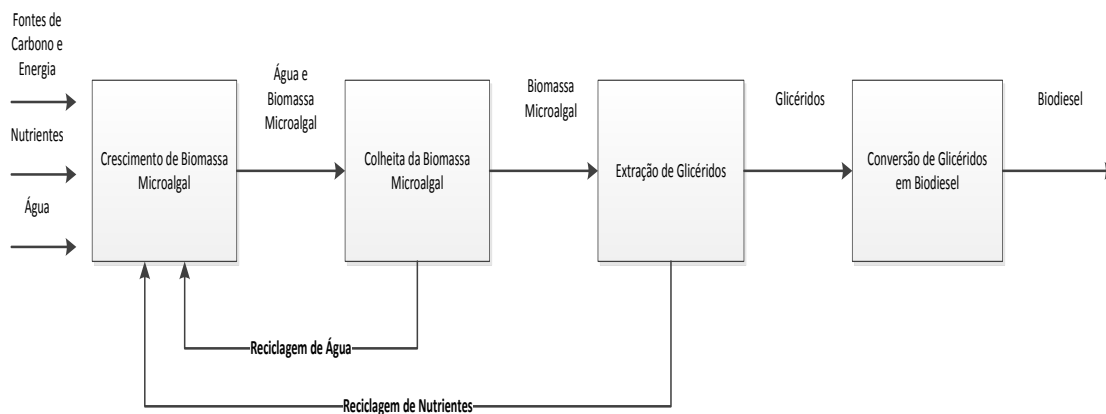


Figura 15:Método de produção convencional do biodiesel a partir de microalgas (adaptado de [25])

1.5. *Objetivos e Estrutura da Presente Dissertação*

O objetivo principal da dissertação consiste na otimização de técnicas de extração de biodiesel de alta qualidade a partir de culturas de microalgas secas, *Nannochloropsis Gaditana* e *Scenedesmus sp.*, cultivadas em Almería, Espanha. O trabalho envolve diversos processos laboratoriais direcionados sempre no sentido de otimização de todo o processo de forma a encontrar um modelo aplicável à escala industrial. A otimização das técnicas de extração merecem um especial interesse devido aos consumos energéticos e respetivos impactos associados. Nesta perspetiva a estrutura da dissertação está orientada da seguinte forma:

- Capítulo 1: Apresentação de uma abordagem introdutória relativa ao panorama energético na Europa e em Portugal, realçando o papel dos biocombustíveis na sociedade atual. São ainda especificados os objetivos do trabalho;
- Capítulo 2: Revisão Bibliográfica sobre a investigação realizada ao nível dos processos utilizados para a produção de biodiesel a partir de microalgas;
- Capítulo 3: Metodologia e métodos utilizados para a realização da componente laboratorial. No decorrer deste capítulo são apresentados diversos procedimentos experimentais;
- Capítulo 4: Apresentação e discussão dos resultados obtidos;
- Capítulo 5: Conclusões gerais, bem como algumas sugestões para trabalhos futuros.

2. Revisão Bibliográfica

A crescente busca por uma alternativa mais eficiente tem atraído diferentes investigadores a utilizarem as microalgas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis. As secções que se seguem pretendem demonstrar aquilo que foi feito e/ou que está a ser desenvolvido relativamente ao processamento da biomassa microalgal para produção de biodiesel. A abordagem ao crescimento e sistemas de cultivo, bem como a colheita da biomassa microalgal é importante para enquadrar o tema em estudo e compreender os mecanismos gerais inerentes ao desenvolvimento das microalgas. Formas inovadoras de processamento, bem como medidas de otimização referidas nos documentos consultados são aqui apresentadas e globalmente descritas.

2.1. *Crescimento e Sistemas de Cultivo de microalgas*

De acordo com Franco *et al.* (2013) as microalgas necessitam de uma fonte de energia, seja a energia luminosa para o crescimento autotrófico ou um composto orgânico para o crescimento heterotrófico. Para além das fontes de carbono comuns no seu crescimento autotrófico (CO_2 ou HCO_3) os autores referem ainda a necessidade de utilização de outros nutrientes, especialmente os macronutrientes (NPK) e micronutrientes (metais). A temperatura e o pH devem estar na faixa de tolerância da microalga cultivada, que pode variar bastante entre géneros e até espécies [26].

No sentido de perceber a relação existente entre o crescimento da biomassa microalgal com a temperatura e regime de nutrientes, Roleda *et al.* (2013) conduziu um estudo que envolveu seis espécies de microalgas (*Thalassiosira pseudonana*, *Odontella aurita*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Chromulina ochromonoides* e *Dunaliella tertiolecta*) cultivadas numa matriz de dois níveis de concentração de nutrientes (elevada e reduzida) e duas condições de temperatura (10°C e 20°C). Neste estudo os autores concluíram que espécies de microalgas cultivadas em regimes de temperatura superior e de elevada concentração de nutrientes exibem taxas de crescimento mais elevadas [27].

O pH dos meios de cultura, segundo Mohan *et al.* (2015), normalmente afeta as reações bioquímicas características das microalgas. Os autores afirmam que a faixa de pH mais favorável para o crescimento de microalgas se encontra a variar entre $7 \leq \text{pH} \leq 9$, o valor ideal está entre 8,2 e 8,7, podendo variar entre diferentes espécies [28]. Um estudo realizado por Belkin e Boussiba (1991) conclui que o crescimento ótimo para a espécie

Cyanobacterium Spirulina platensis é na faixa de pH 9,0-10,0 [29]. Enquanto que, para a espécie *Cryptomonas sp.*, Weisse e Stadler (2006) verificaram crescimento populacional positivo para níveis de pH entre 4,4-9,6 [30].

De acordo com Rawat *et al.* (2013) o método mais comum para o cultivo de microalgas é o cultivo fototrófico. Os dois principais sistemas práticos e viáveis empregados para o cultivo de microalgas são, segundo os autores, os fotobiorreatores tubulares (PBR) e as lagoas abertas (ORP) [31]. Jorquera *et al.* (2010) conduziram um estudo com o intuito de comparar três diferentes sistemas de cultivo de microalgas, sistema aberto (tipo ORP), fotobiorreator de placa plana e fotobiorreator tubular horizontal (Figura 16).

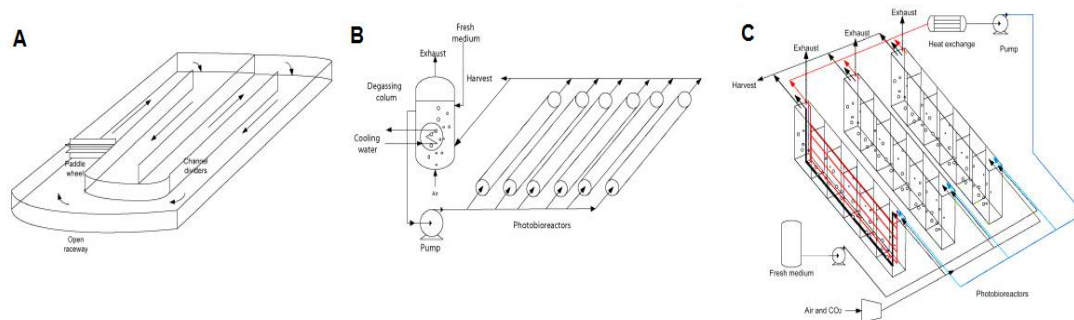


Figura 16: Desenho Esquemático dos três sistemas de cultivo de biomassa microalgal: (A) Lagoa Aberta (ORP); (B) Fotobiorreator tubular horizontal; (C) Fotobiorreator de placa plana (adaptado de [32])

Neste estudo concluíram que a concentração final de biomassa era superior nos fotobiorreatores, a fim de se gerar a mesma quantidade de biomassa teria de se aumentar em mais de metade a área da lagoa. Relativamente ao consumo de água, verificaram que com a utilização da lagoa o consumo era dezasseis vezes superior ao verificado pelo fotobiorreator tubular horizontal, o que torna os sistemas abertos menos eficientes a este respeito. O consumo de energia associado a todo o processo de cultivo toma valores mais elevados nos fotobiorreatores, o que os torna, no momento, num sistema de viabilidade reduzida [32].

Um outro estudo realizado por Benabides *et al.* (2013) permitiu concluir que é possível obter-se resultados promissores nestes dois tipos de sistemas de cultivo, quando existe um controlo eficiente da variável temperatura. Neste estudo a temperatura foi mantida a um valor ideal em ambos os casos, no entanto a produtividade nos sistemas PBR's foi bastante superior à verificada pelos sistemas ORP's, resultado este que foi explicado pelo facto de no período noturno a luminosidade ser bastante mais reduzida nos sistemas de lagoa aberta, não existindo uma utilização eficiente de luz por parte deste tipo de sistemas [33].

A produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas exige o seu cultivo a uma escala de nível industrial, dimensionado para o máximo aproveitamento de radiação e sistemas de captação de efluentes, que podem reduzir o custo de produção por unidade de área. Os custos de operação de um fotobiorreator são superiores aos de tanque aberto, mas a eficiência e rendimento em óleo são significativamente maiores, pelo que se consegue amortizar os custos iniciais em médio ou longo prazo. No Quadro 4 são apresentadas algumas comparações relativamente aos tanques abertos e fotobiorreatores.

Quadro 4: Comparação de Parâmetros entre tanque aberto e fotobiorreator (adaptado de [1])

<i>Parâmetros</i>	<i>Tanque Aberto</i>	<i>Fotobiorreator</i>
<i>Iluminação</i>	Razoável	Excelente
<i>Controlo de temperatura</i>	Nenhum	Excelente
<i>Transferência de gás</i>	Baixo	Médio
<i>Produção de oxigénio</i>	Baixo	Elevado
<i>Controlo de espécies</i>	Nenhum	Elevado
<i>Controlo de contaminação</i>	Baixo	Elevado
<i>Custos</i>	Baixo	Elevado
<i>Produção volumétrica</i>	Elevado	Baixo

2.2. Colheita da biomassa microalgal

Segundo Barros *et al.* (2015) a colheita da biomassa microalgal compreende geralmente dois processos fundamentais: o espessamento e a desidratação. Os autores afirmam que estas fases são cruciais para a obtenção de espessura microalgal necessária para dar seguimento a outros processos a jusante. No respetivo artigo os autores esquematizam um diagrama representativo das técnicas de colheita e secagem de microalgas, cujo qual envolve três diferentes métodos: químico, biológico e físico [34].

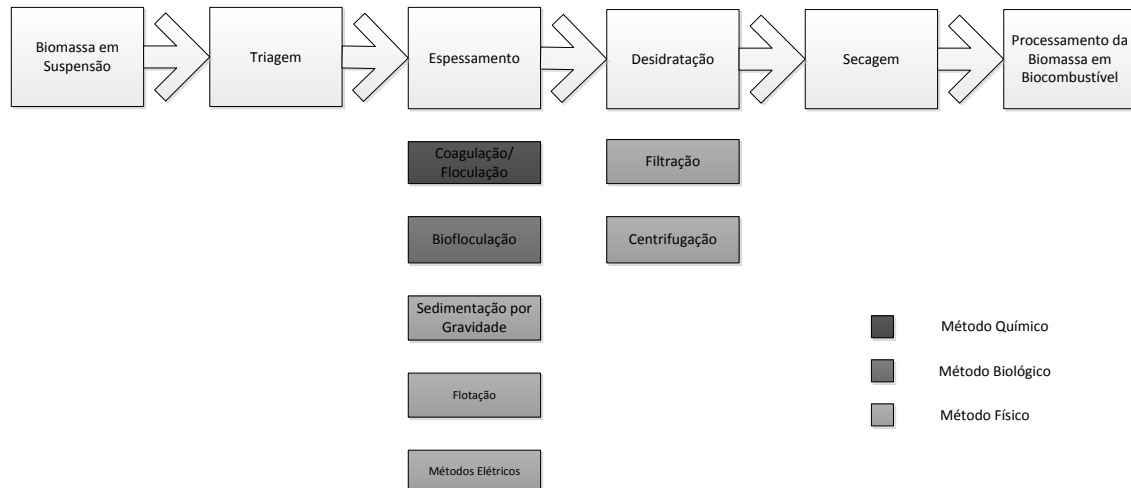


Figura 17: Diagrama das Técnicas de Colheita e Secagem de Microalgas (adaptado de [34])

Christenson e Sims (2011) concluíram que, devido ao pequeno tamanho das células de microalgas, a floculação química deverá ser realizada como um pré-tratamento, pois permite desta forma aumentar o tamanho das partículas antes da aplicação de qualquer outro método, tal como a flotação e a sedimentação para colher as microalgas. Os referidos autores consideram no seu estudo que eletrólitos e polímeros sintéticos são os mais tipicamente utilizados para coagular e flocular as células das microalgas, e sendo o processo realizado num reator misturador, consegue-se uma maior dispersão do coagulante utilizado [35].

Os melhores resultados obtidos por Show e Lee (2014), para um processo de colheita de microalgas recorrendo ao método de sedimentação gravitacional, foram alcançados através de um separador tipo lamela (recuperação de 1,6% de SST (Sólidos Suspensos Totais)) e tanques de sedimentação (recuperação de 3% SST). Segundo os autores este tipo de método é simples e barato, entretanto a concentração de biomassa microalgal conseguida é bastante reduzida, daí a necessidade de serem utilizados agentes floclantes antes da aplicação do respetivo método [36]. Christenson e Sims (2011) concluíram que a viabilidade deste método é muito baixa, pois a taxa de sedimentação das microalgas (0,1-2,6 cm/h) leva à degradação da maior parte da biomassa durante o tempo de estabilização [35].

Bare *et al.* (2003), referenciados por Uduman *et al.*, (2010) verificaram que se consegue uma percentagem de SST de 6% quando se utilizam métodos de colheita baseados no processo de flotação por ar dissolvido. Conclui-se também que para aumentar o rendimento do processo seria necessário iniciar um pré-tratamento por floculação. No mesmo contexto, e em condições idênticas, verificou-se que flotação por ar dissolvido é

mais aconselhável quando equiparado com o processo de sedimentação gravimétrica. A eficácia de cada método foi avaliada de acordo com a turvação da amostra, que para o método de flotação apresentou índices de turbidez mais reduzido [37].

A centrifugação é, segundo Shelef *et al.* (1994), talvez, o método mais rápido e fiável quando se pretende recuperar microalgas em suspensão. Este processo utiliza a força centrífuga para fazer a recuperação com base na diferença de densidades. O bocal do disco da centrifugadora é facilmente limpo e esterilizado e é adequado a todo tipo de microalgas, no entanto verificaram que o respetivo método acarreta um elevado investimento e custos operacionais associados [38].

O processo de filtração convencional para recuperação/colheita de biomassa microalgal é, segundo Uduman *et al.* (2010), sustentável apenas para microalgas com diâmetros elevados. Para diâmetros mais reduzidos é utilizado o sistema de filtração de fluxo tangencial [37]. Petrusevski *et al.* (1995) utilizaram no seu estudo uma membrana com um tamanho de poro de 0,45 μm , onde verificaram que o sistema pode recuperar com sucesso grandes volumes de culturas de microalgas, obtiveram como resultado, uma recuperação total de biomassa microalgal de cerca de 70%- 89% [39]. Os principais problemas associados a este tipo de sistemas são, segundo Uduman *et al.* (2010), o processo de bombagem, pois este tipo de sistemas envolve um sistema de recirculação, e a substituição da membrana devido à incrustação continua provocada pela biomassa microalgal [37].

Lee *et al.* (2013) utilizaram no seu estudo a corrente elétrica como método floculante para colheita de biomassa. Os flocos de biomassa microalgal foram separados por dois processos distintos: (A) – Sedimentação Gravimétrica e (B) – Flotação. Como resultado deste estudo conseguiram uma percentagem de recuperação de 91% para o processo A e 87% para o processo B. Concluíram assim que este é um método eficaz e não necessita de adição de produtos químicos, entretanto os requisitos de alta potência e os custos com eletrodos tornam este método pouco atraente, especialmente para aplicações de larga escala [40].

Uma outra alternativa é a auto floculação. Segundo Horiuchi *et al.* (2003) este processo ocorre a níveis elevados de pH, que podem naturalmente ser causados pelo consumo de CO_2 dissolvido no meio de cultura ou por adição induzida de hidróxido de sódio (NaOH). Os autores relatam que este processo é uma alternativa atraente, pois apresenta baixos custos, baixo consumo de energia, reduzida toxicidade e não requer a adição de floculantes. No seu estudo provocaram a floculação da espécie *Dunaliella tertiolecta* por adição de NaOH. O tempo de sedimentação foi bastante curto (poucos minutos) com um

valor de pH a variar entre 8,6-10,5, o resultado final foi uma eficiência de recuperação de biomassa superior a 90% [41].

A Quadro 5 resume as características das várias técnicas de colheita bem como as vantagens e desvantagens da sua aplicação.

Quadro 5: Comparação entre vários métodos de colheita de microalgas (adaptado de [37 - 41])

<i>Método</i>	<i>SST (%)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
<i>Centrifugação</i>	12,0-22,0	> 90	Método rápido Alta eficiência de Recuperação Apropriado para quase todas as espécies de microalgas	Método caro Elevado consumo energético Dano celular devido às forças de cisalhamento
<i>Filtração Tangencial</i>	5,0-27,0	70-90	Alta eficiência de recuperação Permite a separação de espécies sensíveis ao cisalhamento	Risco de entupimento/custos operacionais Limpeza regular das membranas
<i>Sedimentação Gravimétrica</i>	0,5-3,0	10-90	Método Simples e Barato	Processo demorado Possibilidade de deterioração da biomassa
<i>Flotação por ar dissolvido</i>	3,0-6,0	50-90	Viável para aplicar a grande escala Método de baixo custo Baixos requisitos de espaço Tempo de operação curto	Geralmente requer a adição de floculantes químicos Não viável em microalgas marinhas
<i>Electro floculação</i>	3,0-5,0	80-95	Aplicável a uma ampla variedade de espécies Não requer a adição de floculante químico	Elevados custos energéticos e equipamento de alto valor associado
<i>Bio/Auto floculação</i>	---	25-98	Método barato Permite a reciclagem do meio de cultura Não tóxico para a biomassa microalgal	Alterações na composição celular Possibilidade de contaminação microbiológica

2.3. Extração de Lípidos

Segundo Lee *et al.* (2012) considera-se extração de lípidos a metodologia empregue para remover e recuperar os lípidos do interior das células. Verificou-se que no caso das microalgas, o processo de extração de óleo é apresentado como uma etapa dispendiosa

que dita a viabilidade económica do biodiesel face ao gasóleo. Os autores esquematizam os principais processos aplicáveis à biomassa para extração de lípidos a partir de microalgas, (ver Figura 18) [42].

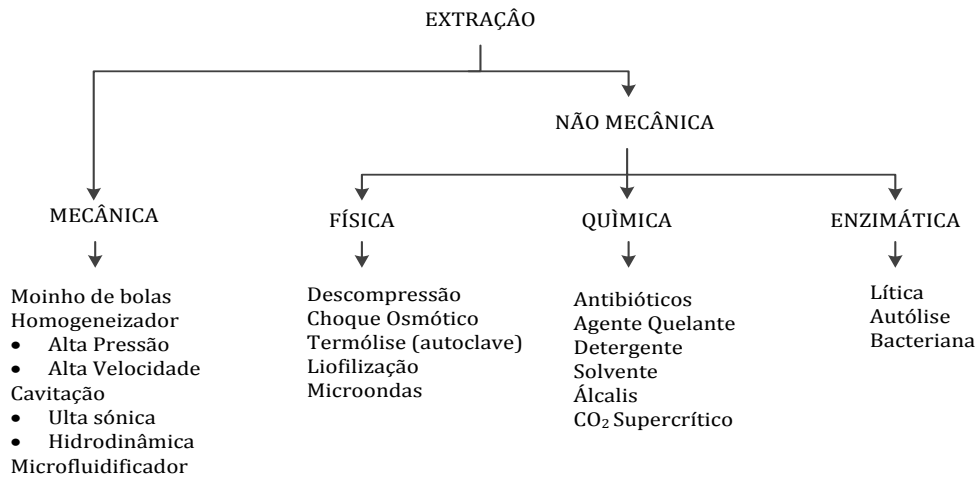


Figura 18: Classificação dos métodos de extração lipídica (adaptado de [42])

Kim *et al.* (2013) afirmam que os métodos mecânicos são utilizados basicamente para provocar a rotura celular através de força física, e a sua principal vantagem é o facto de se poderem aplicar a qualquer tipo de espécie de microalga. No entanto, concluem também que há que ter em conta a economia do processo, o gasto energético e a conservação da qualidade da biomassa final. Relativamente aos métodos não mecânicos, que na maioria dos casos dizem respeito à utilização de solventes orgânicos, verificou-se que são utilizados para procederem ao arrastamento dos lípidos que se encontram no interior das células de microalgas [43].

Por motivos de comparação, vários autores escrevem o rendimento de extração segundo uma percentagem (wt %) que é determinada de acordo com a fórmula que a seguir se apresenta:

$$\text{Rendimento lipídico (wt. \%)} = \frac{\text{massa de óleo (g)}}{\text{massa de microalgas secas (g)}} \times 100$$

Lee e Han (2015) conduziram um estudo com o intuito de combinar o processo de rotura celular com a extração de lípidos das células das microalgas. Foi aplicada cavitação hidrodinâmica em simultâneo com hexano, como solvente de extração, à espécie *Nannochloropsis salina*, para demonstrar de uma forma simples e integrada a produção de óleo a partir de microalgas. Um rendimento lipídico superior foi observado aquando da aplicação de HC (*hydrodynamic cavitation*) (25,9- 99,0 wt.%) em comparação com autoclave (16,2-66,5 wt.%) e com ultrassons (5,4-26,9 wt.%), para níveis de consumo energético específico a variar entre 500-10 000 kJ/kg. Os autores concluíram que,

considerando a capacidade de extração comparável e o potencial de eficiência energética, a cavitação hidrodinâmica pode ser um método promissor a aplicar à escala industrial quando o objetivo é obter óleo a partir de microalgas [44].

Dai *et al.* (2014), com o intuito de perceber o poder de extração de lípidos através da aplicação do método de micro-ondas, utilizaram no seu estudo, por motivos de comparação, o método de aquecimento convencional e o método de micro-ondas para rotura celular, Figura 19. Também, e como método de extração do conteúdo lipídico, analisaram o desempenho de diferentes solventes: n-hexano, isopropanol e n-hexano/isopropanol.

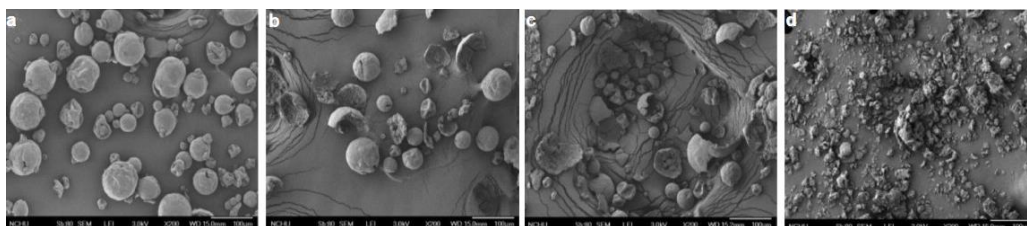


Figura 19: Processo de rotura celular usando vários métodos de tratamento: (a) Sem tratamento, (b) Calor, (c) ultrassons e (d) micro-ondas (adaptado de [45])

Verificaram que para 5g de microalgas secas, conseguiu-se para o sistema de aquecimento convencional, ultrassons e micro-ondas um rendimento oleico de 14 (wt.%), 5 (wt.%) e 18 (wt.%), respetivamente. Verificou-se também que, com a aplicação da mistura n-hexano/isopropanol (2:1), para remoção do conteúdo lipídico, em combinação com o método de micro-ondas, para rotura celular, o valor do rendimento oleico obtido é elevado para os 28 (wt.%) [45].

Com o intuito de comparar a capacidade de extração de lípidos a partir de microalgas entre solventes orgânicos e CO₂ supercrítico (SFE –*Supercritical Fluid Extraction*), Cheng *et al.* (2011) utilizaram a espécie *Pavlova sp.*. Em ambos os métodos utilizou-se um pré-tratamento para rotura celular: ultrassons para extração via solvente orgânico e *bead-beating* para extração via SFE. Como resultados verificaram um rendimento lipídico superior no caso da aplicação de solventes orgânicos (44,7 wt.%) em comparação com o obtido pelo método SFE (17,9 wt. %). No entanto os resultados obtidos aquando do cálculo do rendimento de extração de biodiesel permitiram concluir que existe uma maior seletividade para extração de triglicerídeos aquando da aplicação do SFE (15,7 wt.%) comparativamente com o verificado com a aplicação de solvente orgânico (15,6 wt. %) [46].

Lee *et al.* (2010) avaliaram o desempenho de cinco diferentes solventes a aplicar no processo de extração de lípidos da microalga *Botryococcus braunii*: clorofórmio/metanol (2:1, v/v), hexano/isopropano (3:2, v/v), diclorometano/metanol (1:1, v/v),

diclorometano/etanol (1:1, v/v) e acetona/diclorometano (1:1, v/v). A mistura clorofórmio/metanol foi a que revelou um rendimento oleico mais elevado, 28,6 (wt. %). No mesmo estudo, e no sentido de avaliar qual o efeito da rotura celular sobre o rendimento da extração lipídica, foram utilizados em conjunto cinco métodos mecânicos distintos (autoclavagem, *bead-beating*, micro-ondas, ultrassons e choque osmótico) com uma mistura de clorofórmio/metanol (1:1, v/v). Nas três espécies de microalgas em estudo, *Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp., verificaram-se rendimentos de extração superiores aquando da aplicação da radiação micro-ondas [47]. No sentido de minimizar o tempo de extração, Botelho (2008) realizou vários ensaios através da utilização de ultrassons conjugado com diferentes solventes orgânicos para determinar o tempo ótimo de extração. Os ensaios realizados encontram-se na gama dos 2-15 minutos de utilização do aparelho. O autor verificou que o rendimento de extração determinado com a aplicação de diferentes solventes começa a diminuir a partir dos 4 minutos de operação. Nestas condições, o tempo ideal de extração foi estabelecido pelo autor em 5 minutos. Com esta redução de tempo concluiu que era possível processar a biomassa de uma forma mais rápida e com uma redução do consumo de energia [48].

O Quadro 6 apresenta resultados obtidos por parte de diversos autores, dos vários consumos de energia e níveis de rendimento associados ao processo rotura celular para posterior extração lipídica. O consumo de energia em cada processo citado foi convertido para consumo específico de energia, em MJ kg⁻¹ de massa seca, de forma a possibilitar a comparação entre os diferentes métodos.

Quadro 6: Processo de rotura celular e consumos de energia associados

Método	Espécie e condições de estudo	Energia Consumida, GJ m ⁻³ células em suspensão	Energia Consumida, MJ kg ⁻¹ massa seca	Escala de Uso	Nível de Rendimento e Extração	Ref.
Ultrassons	<i>Chlorococcum</i> sp. (200mL, 8,5kg m ⁻³ , 750W, 5min.)	1,125	132	Laboratorial /Industrial	Baixo	[49]
Homogeneizador de Alta Pressão	<i>Chlorococcum</i> sp. (200mL, 8, 5kg m ⁻³ , 2,5kW, 5min.)	4,5	529	Laboratorial /Industrial	Elevado	[49]
Homogeneizador de Alta Velocidade	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (0,8L, 10kg m ⁻³ , 600W, 15min.)	0,675	67,5	Laboratorial /Industrial	Médio	[50]
Moinho de Bolas	<i>Scenedesmus</i> (100mL, 5kg m ⁻³ , 840W, 5min.)	2,52	504	Laboratorial /Industrial	Elevado	[47]
5 Micro-ondas	<i>Scenedesmus</i> (100mL, 5kg m ⁻³ , 700W, 5min.)	2,1	420	Laboratorial	Elevado	[47]
6 Cavitação Hidrodinâmica	<i>Nannochloropsis salina</i> (20g/L, 1,27 kW, 5,9 min.)	10	500	Laboratorial /Piloto	Médio	[44]

A seleção de solventes para extração de lípidos assume um papel fundamental. É essencial que o solvente escolhido apresente uma boa capacidade de extração e baixa viscosidade de forma a permitir a sua livre circulação. Ashokkumar *et al.* (2014) investigou a capacidade de extração lipídica de dez diferentes sistemas de solventes, aplicáveis à espécie *Botryococcus*. Antes da aplicação do solvente para extração, a biomassa microalgal passou por um pré-tratamento de rotura celular através do método de ultrassons. Os resultados obtidos pelos autores são apresentados no Quadro 7 [51].

Quadro 7: Otimização de diferentes sistemas de solventes (adaptado de [51])

Solvente/Mistura de Solventes	Relação	Rendimento Lipídico (wt.%)
Álcool Isopropílico	-	14,00
Diclorometano	-	14,02
Hexano + Éter dietílico	1:1	20,15
Clorofórmio + Metanol	2:1	23,50
Ciclo-hexano + Metanol	3:1	26,30
Acetonitrilo	-	15,40
Hexano + Cloreto de Metileno	1:3	24,20
Hexano + Metanol	1:1	23,10
Tetraidrofurano	-	22,50
Hexano + Etanol	1-1	20,08

2.4. Conversão de Lípidos

Segundo Fuls *et al.* (1984) após a extração de lípidos a partir de microalgas, um processo de conversão é necessário para produzir o biodiesel, pois a viscosidade de óleo extraído ainda é demasiado elevada para ser utilizado como combustível [52]. Um método comum que reduz a viscosidade do óleo de microalgas é, segundo Chisti (2008), a reação de transesterificação, uma reação química que converte óleos de microalgas (TAG) em FAME, que é também conhecido por biodiesel [14]. Kim *et al.* (2013) apresentam uma abordagem de diferentes processos de transesterificação aplicáveis ao óleo de microalgas, que é esquematizada na seguinte figura [53].

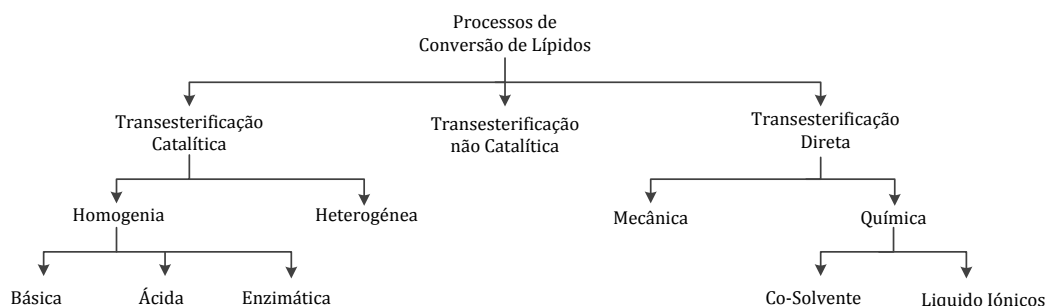


Figura 20: Diferentes processos de conversão de óleo de microalgas (adaptado de [53])

Um estudo realizado por Schuchardt *et al.* (1998) permitiu concluir que catalisadores básicos são mais recomendados, pois apresentam um custo reduzido e a sua utilização é conseguida a uma pressão e temperatura de reação moderada, o que lhes proporciona uma vantagem em termos económicos. Além disso, verificaram também, que a cinética da reação é rápida o que proporciona um elevado rendimento na produção de biodiesel [54]. Por outro lado, Vicente *et al.* (2004) concluíram que uma elevada concentração de ácidos gordos livres é um fator chave que impede elevados rendimentos na recuperação de biodiesel, devido ao fenómeno de saponificação, que resulta, segundo os autores, de uma reação direta entre o grupo hidróxido de catalisadores alcalinos e os ácidos gordos presentes no óleo proveniente de microalgas [55].

No sentido de perceber o desempenho de catalisadores ácidos no processo de transesterificação, Fukuda *et al.* (2001) verificaram que o ácido clorídrico é o catalisador mais eficiente a se aplicar, pois é relativamente catalítico e apresenta um preço reduzido. Concluíram também que para este tipo de processo a velocidade de reação aquando da sua aplicação é quatro mil vezes mais reduzida quando comparada com a de catalisadores básicos, tornando este tipo de catalisadores com um nível de utilização reduzido [56]. A principal vantagem da utilização de catalisadores ácidos é, de acordo com Kawashima *et al.* (2009), o facto de poderem ser utilizados para processar óleos com elevada concentração de ácidos gordos livres, onde o fenómeno de saponificação não se verifica [57].

Com o objetivo de combater as dificuldades verificadas com a utilização de catalisadores básicos ou ácidos, Jegannathan *et al.* (2008) recorreram à transesterificação com catálise enzimática. Lípase foi utilizada de forma eficaz devido à sua tolerância a elevadas concentrações de ácidos gordos livres e água, bem como às condições moderadas de reação. Concluíram que o facto de não ocorrer saponificação durante o processo é uma mais-valia pois não existe a necessidade de separação e purificação adicional, além disso verificaram também que a capacidade de reutilização da enzima torna o processo eficiente

e com elevado rendimento por unidade de custo de produção [58]. Suali e Sarbatly (2012) referem que sistemas à base de enzimas também enfrentam vários desafios que os impedem de ser usados como plataforma de transesterificação. Referem que a atividade enzimática é influenciada por diversos fatores, tal como o pH da reação, as concentrações de substrato e enzimas e as distâncias de interações entre substratos e enzimas [59].

Umdu *et al.* (2008) conduziram um estudo com o intuito de perceber o efeito da aplicação de catalisadores heterogéneos no processo de conversão de óleo proveniente da espécie *Nannochloropsis oculata*. Utilizaram CaO e MgO suportados por Al₂O₃ em diferentes níveis de carga, 0%, 50% e 80%. As condições iniciais foram, estabelecidas a uma temperatura de 50 °C e uma relação metanol/óleo de 6:1. Para níveis de carga de 0% não se verificou rendimento de biodiesel, enquanto para níveis de 80% conseguiram rendimentos de biodiesel 4-5 vezes superior às cargas de 50% de Al₂O₃. (23 wt.% CaO/Al₂O₃ e 16 wt% MgO/ Al₂O₃). Concluíram também que a relação metanol/óleo assume um papel fundamental no rendimento lipídico [60].

Quadro 8: Diferentes métodos de transesterificação Catalítica

Transesterificação Catalítica	Especificação	Observação	Ref.
<i>Homogénea básica</i>	Elevada velocidade de reação Baixo custo Condições moderadas de reação	Dependência de água e FFA (saponificação) Gestão de Resíduos	[55]
<i>Homogénea ácida</i>	Não depende dos FFA Esterificação e transesterificação em simultâneo	Velocidade de reação baixa Corrosão Gestão de resíduos	[55] [56] [57]
<i>Heterogénea</i>	Esterificação e transesterificação em simultâneo (ácido) Reduzida gestão de resíduos	Dependência de água e FFA e elevada temperatura de reação (base) Alto custo	[60]
<i>Homogénea enzimática</i>	Não depende dos FFA Reduzida Gestão de Resíduos (Separação fácil do produto)	Controlo de pH Desnaturação/Imobilização Alto custo	[58] [59]

Patil *et al.* (2012) estudaram a possibilidade de conversão de óleo de microalgas através de um processo de transesterificação não catalítica. No seu relatório verificaram que, em condições ideais, usando metanol supercrítico (SCM) com a espécie *Nannochloropsis oculata* obtém-se um rendimento de conversão de 84,2 wt.% a 250°C durante 25 minutos e para uma razão de algas/metanol 1:8 (wt./vol). No entanto, os autores concluíram que este processo ainda é uma tarefa difícil pois os requisitos de energia à entrada, o elevado custo de construção e os custos de monitorização dos sistemas ainda são excessivamente altos [61].

Rawat *et al.* (2013) afirma que a transesterificação direta é uma nova técnica que tem o potencial para redução de unidades de processamento e custos do processo de conversão [62]. Ehimen *et al.* (2010) conseguiram aumentar o rendimento de produção de biodiesel em 20% com a aplicação do método de transesterificação direta em comparação ao verificado recorrendo ao método convencional [63]. Haas (2012) relatam que o uso de transesterificação direta elimina os passos de extração via solvente orgânico, diminuindo desta forma o custo global do processo de produção de biodiesel a partir de microalgas [64]. A Figura 21 apresenta um esquema representativo do estudo realizado por Ehimen *et al.* (2010) no qual se recorreu ao método de transesterificação direta [63].

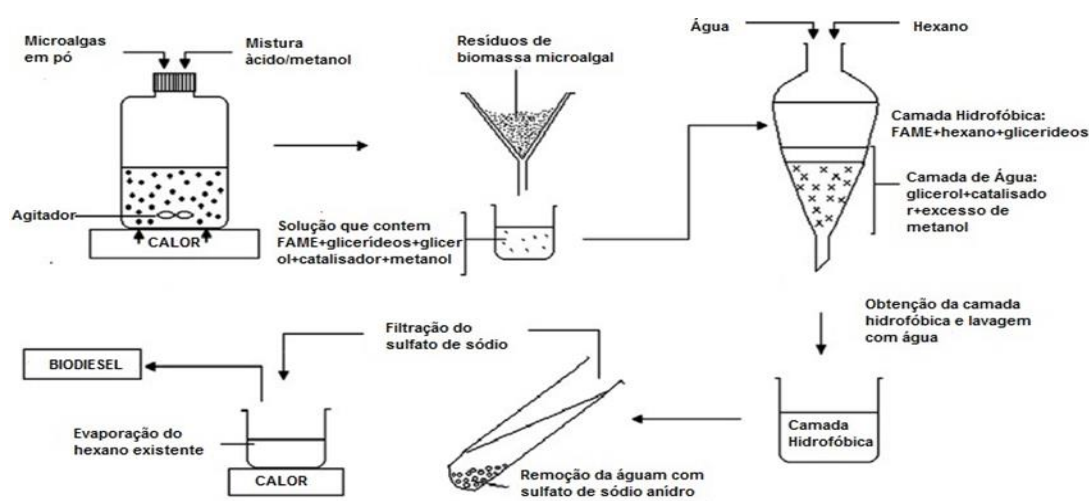


Figura 21: Representação esquemática de um processo de transesterificação direta (adaptado de [63])

Patill *et al.* realizaram um estudo no qual utilizaram um processo de transesterificação direta assistido por um método de radiação micro-ondas. Para a espécie do género *Nannochloropsis*, uma proporção de microalgas: metanol 1:12 (wt./vol.), uma concentração de KOH de 2% em peso e um tempo de reação de 4-5 minutos a 60-64 °C, os autores conseguiram uma eficiência de conversão de 80,1 wt. %. Concluíram desta forma que forças mecânicas auxiliadas ao processo de transesterificação direta podem aumentar o rendimento obtido [61].

A utilização de um sistema de co-solvente no processo de transesterificação direta é, segundo Xu *et al.* (2011), uma forma de maximizar o rendimento de biodiesel, melhorando a eficiência de extração de lípidos. É utilizada uma mistura de dois solventes orgânicos diferentes, como por exemplo o sistema de co-solvente diclorometano/metanol, para provocar a extração de lípidos e assim aumentar a eficiência do processo. Os autores afirmam que é importante que o solvente utilizado seja miscível com o metanol e insolúvel

em água. Relativamente ao catalisador, este deve ser uma base ou ácido concentrado, na ausência de água [64].

Young *et al.* (2011) relatam líquidos iónicos podem ser bastante úteis quando utilizados no processo de transesterificação direta para a produção de biodiesel. Têm alta solubilidade e baixa pressão de vapor, além disso não são voláteis, são termicamente estáveis e recicláveis após a reação de transesterificação. O principal inconveniente dos líquidos iónicos é, segundo os autores, o elevado custo associado [65].

2.5. Síntese

Nestes dois primeiros capítulos, foram abordados vários assuntos no que diz respeito à produção de biodiesel a partir de microalgas, desde o processo de seleção e cultivo da matéria – prima utilizável, que tanto pode ser de origem de água doce como de água salgada, até ao seu processo de conversão em produto final, biodiesel. Para além dos custos de produção da biomassa, bem como os associados ao processo de colheita e secagem, a extração lipídica assume-se como uma das etapas fundamentais, cujo custo associado define a viabilidade económica da produção de biodiesel. Fatores como o rendimento de extração, balanço energético e tempo de extração, são indicadores que permitem avaliar a eficiência do processo de extração lipídica. A sua complexidade e custo tem vindo cada vez mais a merecer a atenção de muitos estudos realizados nesta área. O processo de extração lipídica para conversão em biodiesel segue essencialmente duas vias: extração exclusivamente mecânica, por exemplo com a aplicação de um processo de homogeneização ou cavitação; ou extração não mecânica onde se utilizam enzimas, reagentes, ou até mesmo métodos físicos como a radiação de micro-ondas. A conjugação destas duas vias, como é o caso da aplicação do banho de ultrassons para rotura celular com um respetivo sistema de solventes de extração (diclorometano/metano, n-hexano, clorofórmio, n-hexano/isopropanol), pode garantir rendimentos de extração lipídica bastante superiores. É neste sentido que se insere o objetivo principal deste trabalho, que tem como intuito otimizar o respetivo processo de extração lipídica, cuja metodologia utilizada será apresentada no capítulo seguinte.

3. Metodologia

Uma vez que o presente trabalho compreende uma componente laboratorial, a metodologia utilizada assenta na criação de um procedimento que envolve diferentes etapas, sendo aplicada a cada uma delas medidas de otimização de forma a aumentar o rendimento do processo de produção de biodiesel a partir de microalgas. A revisão bibliográfica foi uma mais-valia, pois permitiu aprofundar o conhecimento sobre as etapas de produção de biodiesel a partir de microalgas, tornando-se desta forma num apoio fundamental para o desenvolvimento do trabalho laboratorial.

Inicialmente foi utilizado um procedimento, transmitido por comunicação pessoal pela investigadora Smritikana Dutta do Centro de Tecnologia Mecânica e Automação, cujo princípio encontra-se exemplificado na seguinte Figura 22.

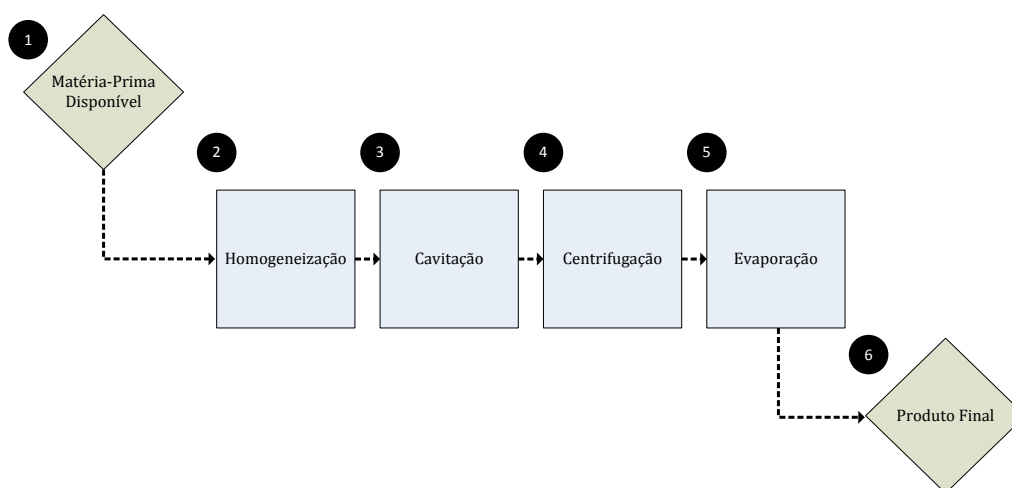


Figura 22: Procedimento base aplicado ao processo de extração lipídica

O respetivo procedimento representa o processo de extração lipídica, onde se insere o objetivo principal da presente dissertação. Como se irá verificar no seguimento deste trabalho, este é o modelo que serve de base para o desenvolvimento de todo o trabalho experimental, tendo sido adaptado também de acordo com o material e equipamentos disponíveis para utilização em laboratório.

No sentido de otimizar o respetivo procedimento procurou-se criar variações nas diferentes etapas do processo de extração lipídica, nomeadamente nos pontos 1, 2 e 3 da figura apresentada anteriormente. A matéria-prima disponível diz respeito a duas espécies de microalgas, *Nannochloropsis gaditana* e *Scenedesmus sp.*, portanto, é essencial perceber qual das espécies apresenta maior potencial de produção de biodiesel aquando da utilização deste procedimento. O processo de homogeneização consiste na mistura, por agitação magnética, da espécie de microalga em análise com um respetivo solvente/reagente de extração. Selecionou-se uma diversidade de solventes de extração

com diferentes níveis de polaridade, de forma a perceber se existem alterações quando se provoca a variação no tipo de solvente utilizado. A Figura 23 esquematiza as espécies de microalgas e os solventes de extração utilizados neste modelo de extração lipídica.

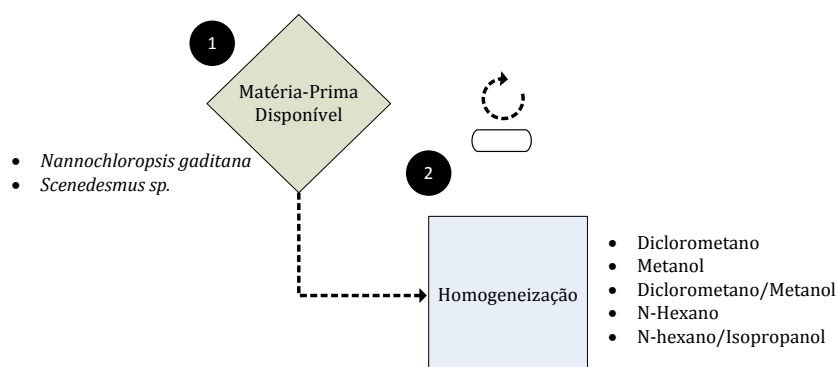


Figura 23: Variações aplicadas à etapa 1 e 2 do modelo de extração lipídica

Relativamente à cavitação, processo este que consiste na rotura celular das células da espécie de microalgas em estudo, utilizou-se o banho de ultrassons com o intuito de perceber se a conjugação de um método mecânico com um não mecânico influenciava o rendimento do processo. Na mesma ordem de seguimento também se fez variar o tempo de exposição da amostra a este equipamento, metodologia esta bastante importante pois podem-se verificar poupanças em termos energéticos assim como diminuição do tempo do procedimento de extração lipídica, Figura 24.

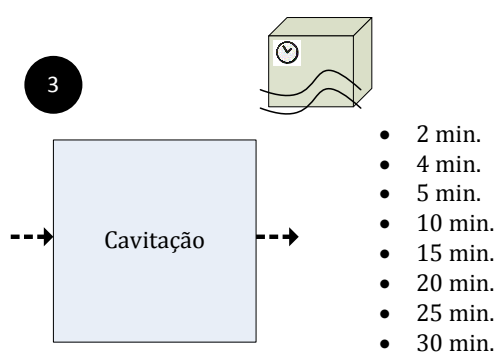


Figura 24: Variações aplicadas à etapa 3 do modelo de extração lipídica

Às restantes etapas não foram aplicadas medidas de otimização por motivos relacionados com o espaço temporal disponível para a realização deste trabalho e também por falta de material e equipamentos essenciais para os restantes procedimentos.

Depois de avaliadas as diferentes medidas aplicadas às respetivas etapas do modelo de extração lipídica, implementou-se um método para converter o óleo proveniente das

microalgas em biodiesel, ou seja, um processo de transesterificação. O conteúdo lipídico utilizado como base neste processo, corresponde ao obtido já depois da aplicação das medidas de otimização no processo de extração, pois pretende-se nesta fase apenas converter óleo de microalgas em biodiesel, o modelo utilizado pode ser verificado na seguinte Figura 25.

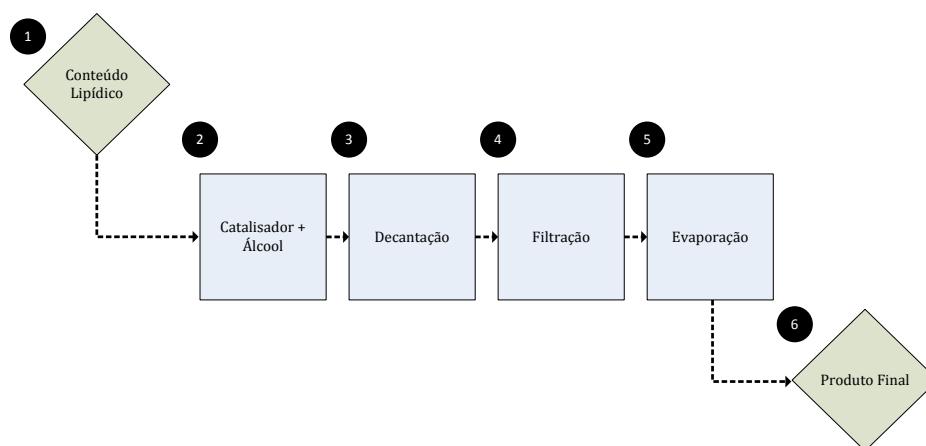


Figura 25: Procedimento utilizado no processo de conversão do conteúdo lipídico em biodiesel

3.1. Materiais e Equipamentos

As microalgas utilizadas neste estudo, *Nannochloropsis gaditana* e *Scenedesmus sp.*, Figura 26, foram cedidas pela Universidade de Almeria (Espanha). De notar que a *Scenedesmus sp.* é uma alga de água doce enquanto a *Nannochloropsis* é de água salgada.

Embora o crescimento das microalgas não tenha sido objetivo de estudo neste trabalho, é importante salientar que foram cultivadas em regime fototrófico num fotobiorreator e colhidas em fase final de crescimento. Após a colheita da biomassa procedeu-se à sua secagem por liofilização até peso constante, tendo sido esta a matéria-prima utilizada nos diferentes ensaios realizados no decorrer do trabalho.

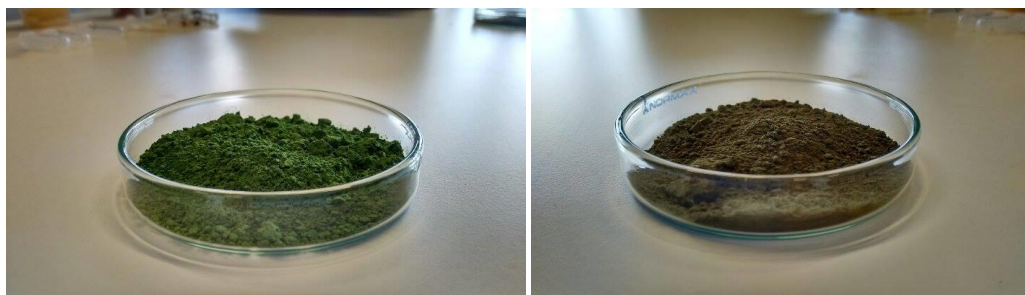


Figura 26: Biomassa microalgal seca pulverizada: *Scenedesmus sp.* (esquerda) e *Nannochloropsis gaditana* (direita)

A lista de reagentes utilizados ao longo dos diversos trabalhos pode ser visualizada no Quadro 9.

Quadro 9: Lista de reagentes, respetivas purezas e marcas

Reagente	Fórmula Química	Massa Molar (g/mol)	Densidade (kg/m ³)	Ponto de Ebulição (°C)	Pureza (%)	Marca
<i>Etanol</i>	C ₂ H ₆ O	46,07	789,00	78,37	99,9	Carlos Erba
<i>Metanol</i>	CH ₄ O	32,04	791,80	64,70	99,8	ACROS ORGANICS
<i>n-Hexano</i>	C ₆ H ₁₄	86,18	654,80	68,00	99,0	ACROS ORGANICS
<i>Diclorometano</i>	CH ₂ Cl ₂	84,93	1 330,00	39,6	99,8	ACROS ORGANICS
<i>Isopropanol</i>	C ₃ H ₈ O	60,1	786,00	82,6	≥99,8	SIGMA-ALDRICK

A lista de equipamentos utilizados ao longo dos diversos trabalhos pode ser visualizada no Quadro 10.

Quadro 10: Lista de materiais, equipamentos e respetivas marcas

Equipamento ou material	Marca e Modelo
Gobelé 100-150 ml	Linex
Espátula	Selecta
Balança Analítica	VWR, LA214i
Agitador Magneto	IKA, RCT B
Papel de Alumínio	Silvex
Banho de Ultrassons	VWR, USC300THD
Tubo Centrifugo 15 ml	Deltalab
Centrifugadora	Thermo scientific, Heraeus Multifuge X1
Balão de fundo redondo 100-250 ml	NORMAX
Placa de Aquecimento	IKA, RCT B
Ampola de decantação 500 ml	Lenz
Papel indicador de pH	EMD Millipore
Filtro de Papel	Whatman, Cat No 1440 110
Estufa	VWR, DL 115

3.2. Processo de Extração Lipídica

Como já foi referido anteriormente, o objetivo deste trabalho consiste na otimização de técnicas de extração para produção de biodiesel de microalgas. Para alcançar o objetivo proposto realizaram-se no decorrer do presente trabalho diversos procedimentos experimentais que são apresentados em seguida.

A combinação entre o processo de rotura celular e extração lipídica via solvente orgânico permite minimizar o tempo despendido, bem como os consumos energéticos associados. Para tal, utilizou-se o banho de ultrassons, Figura 27, também conhecido por gerador de ondas ultrassónicas de baixa frequência, que é comumente empregue em laboratórios de

química e biologia, seja para limpeza de materiais, solubilização de sais ou rompimento celular, que é o que se pretende com a sua aplicação.



Figura 27: Banho de ultrassons

Com o intuito de perceber o desempenho da aplicação do processo mecânico (banho de ultrassons) perante o resultado final do processo de extração em análise, realizou-se um estudo com a espécie *Nannochloropsis gaditana*, cujo procedimento é apresentado em seguida e é o que serve de base no decorrer do presente trabalho:

1. Pesou-se 2 g de biomassa seca, em triplicado, para dentro de um goblé de 100 ml;
2. Adicionou-se à biomassa 60 ml de uma solução de diclorometano/metanol (2:1, v/v), coberta por papel de alumínio para evitar evaporação;
3. Colocou-se a mistura em agitação magnética durante 30 minutos a 700 rpm à temperatura ambiente;
4. Após os 30 minutos de agitação, a mistura foi colocada em banho de ultrassons na potência máxima, durante mais 30 minutos à temperatura ambiente;
5. De forma a separar as fases obtidas, centrifugou-se a mistura (resíduo de biomassa/solvente + lípidos) durante 5 minutos a 3 000 rpm;
6. Pesou-se um balão de fundo redondo (100 ml) em vazio;
7. A fase que contém o solvente e a respetiva fração de lípidos foi transferida para o balão;
8. Para remover o solvente a mistura foi colocada na *hotte* em banho termostático à respetiva temperatura de evaporação;
9. Pesou-se o balão com o resultado obtido e através da diferença com o resultado em vazio obteve-se o produto final do respetivo método.

Seguidamente, avaliou-se o potencial de produção das diferentes espécies. De acordo com a revisão bibliográfica percebe-se que a percentagem de conteúdo lipídico varia de espécie para espécie, de tal forma que espécies com superior percentagem apresentam superior potencial de produção de óleo para conversão em biodiesel. Deste modo realizou-se um

estudo com ambas as espécies disponíveis, no qual se utilizou para cada uma o procedimento de base anteriormente apresentado.

A próxima fase corresponde à seleção do melhor sistema de solventes. Pretende-se com este processo submeter a espécie *Nannochloropsis gaditana* a uma diversidade de solventes, de forma a conseguir-se perceber qual o solvente ou mistura de solventes que proporciona um superior rendimento de extração. Os solventes utilizados neste estudo são o metanol, n-hexano, diclorometano, diclorometano/metanol (2:1, (v/v)), e n-hexano/isopropanol (3:2, (v/v)).

Torna-se neste momento necessário definir o melhor tempo de extração em ultrassons, tentando otimizar o processo em termos de energia e tempo despendido. Na tentativa de perceber a possibilidade de minimizar o tempo despendido durante o processo de rotura celular, foram realizados vários ensaios através da utilização da espécie *Nannochloropsis gaditana* e três sistemas de solventes orgânicos de extração (metanol, diclorometano/metano e n-hexano) para períodos de tempo de 2, 4, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos.

3.3. Transesterificação

Finalmente, no sentido de converter o óleo proveniente do processo de extração recorreu-se à etapa de transesterificação recorrendo a um catalisador ácido. O procedimento utilizado em todos os ensaios experimentais foi o seguinte:

1. Ao óleo resultante da fase extração adicionou-se, nas quantidades pretendidas, uma mistura de metanol com ácido clorídrico (para 1g de conteúdo lipídico utilizou-se 30 mL de uma mistura de metanol com ácido clorídrico);
2. Para ajudar na separação das fases adicionou-se n-hexano e a mistura foi colocada numa ampola de decantação;
3. Deixou-se separar as fases na ampola durante 12 horas;
4. Separou-se as fases obtidas: A) Hexano + Biodiesel e B) Glicerol + Catalisador + Excesso de Metanol;
5. Lavou-se consecutivamente com água previamente aquecida a 60°C a fase A), adicionando e fazendo uma mistura suave entre as fases;
6. Verificou-se o pH da última solução de lavagem, com papel indicador, para garantir um pH neutro;
7. Drenou-se a solução resultante para um balão de fundo plano e seco;
8. Filtrou-se a solução recorrendo a um funil e papel de filtro;

9. Para remover o n-hexano a mistura foi colocada na *hotte* em banho termostático à respetiva temperatura de evaporação;
10. Guardou-se a amostra para posterior análise por cromatografia em camada gasosa.

A figura que a seguir se apresenta diz respeito à visualização das diferentes fases verificadas na ampola de decantação:

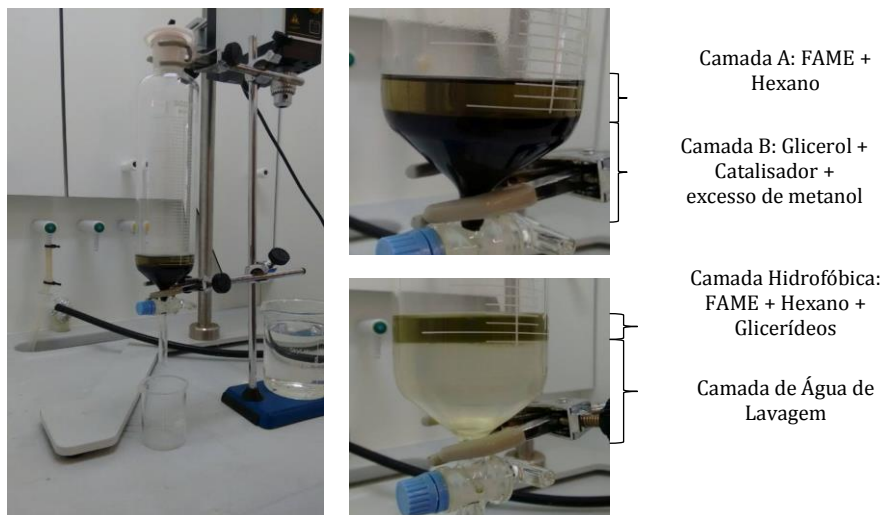


Figura 28: Diferentes Fases verificadas na ampola de decantação

4. Apresentação e Discussão de Resultados

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos referentes a todo o processo experimental, que envolve o processo de extração lipídica e transesterificação para conversão do óleo de microalgas em biodiesel. O trabalho experimental teve maior ênfase no processo de extração, pois, de acordo com o objetivo da presente dissertação, pretende-se otimizar as técnicas de extração de modo a tornar todo o processo economicamente viável a nível industrial. No entanto, também se realizou o processo de transesterificação com o intuito de produzir biodiesel aplicável em motores de combustão.

4.1. Extração Lipídica

Para determinar a eficiência de extração lipídica e respetiva eficiência de conversão em biodiesel utilizou-se um método quantitativo bastante simples que consiste na diferença de massas recorrendo a uma balança analítica.

O ponto de partida deste trabalho envolve um processo de extração via solvente orgânico no qual foram utilizadas 2g de microalgas previamente secas da espécie *Nannochloropsis gaditana*. Conseguiu-se como resultado de extração um rendimento lipídico de 14,0 (wt. %), nesta fase inicial utilizou-se como reagente de extração uma mistura de 60 ml de diclorometano e metanol nas proporções 2:1. Quando as células de microalgas são expostas à solução de solvente orgânico, esta penetra através da membrana celular para o citoplasma e interage com os lípidos presentes utilizando forças de van der Waals para formar um complexo solvente orgânico-lípido. Este complexo acionado por um gradiente de concentração difunde-se através das membranas celulares ficando em torno das células. Consequentemente, os lípidos são extraídos para fora das células e permanecem dissolvidos no solvente orgânico, onde são depois recuperados por evaporação do reagente de extração à respetiva temperatura de ebulição.

4.1.1. Influência da aplicação do banho de ultrassons

Tendo em consideração o material disponível para a realização desta dissertação utilizou-se o banho de ultrassons como método mecânico de cavitação para auxiliar o processo de extração lipídica via solvente orgânico. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 29.

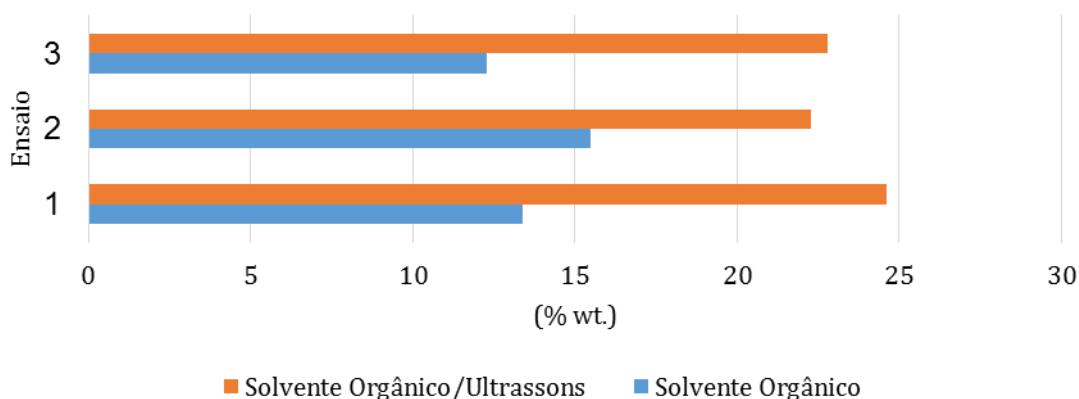


Figura 29: Eficiência de extração com e sem a aplicação do banho de ultrassons à espécie *Nannochloropsis gaditana*

De acordo com a Figura 29 percebe-se que com a aplicação do banho de ultrassons consegue-se obter um rendimento de extração na ordem dos 23,2 (wt.%), ou seja, valor este bastante superior ao verificado aquando da utilização de apenas solvente orgânico para extração. Este valor encontra-se dentro da gama de resultados obtidos por Lee e Han, (5,4 – 26,9 wt.%), que conduziram um estudo também com a microalga do género *Nannochloropsis* recorrendo ao método de combinação de banho de ultrassons com solvente de extração [44]. Esta variação pode ser explicada pela capacidade das ondas de ultrassons acelerarem sensivelmente o processo. Os ultrassons são ondas de pressão de elevada frequência que criam bolhas de cavitação, que ao colapsarem, danificam as células promovendo a libertação do seu conteúdo para o meio envolvente, facilitando assim o processo de extração via solvente orgânico.

4.1.2. Avaliação do potencial de produção de diferentes espécies

Foi feita então uma avaliação da adequabilidade de cada uma das microalgas, *Nannochloropsis gaditana* e *Scenedesmus sp.* como matéria-prima para a produção de biodiesel. Utilizou-se como valores de referência os apresentados no Quadro 3, de forma a perceber se os resultados obtidos se enquadram ou não no referenciado pelo respetivo autor [21]. As diferenças existentes no que diz respeito ao potencial de produção de óleo para conversão em biodiesel podem ser visualizadas na Figura 30.

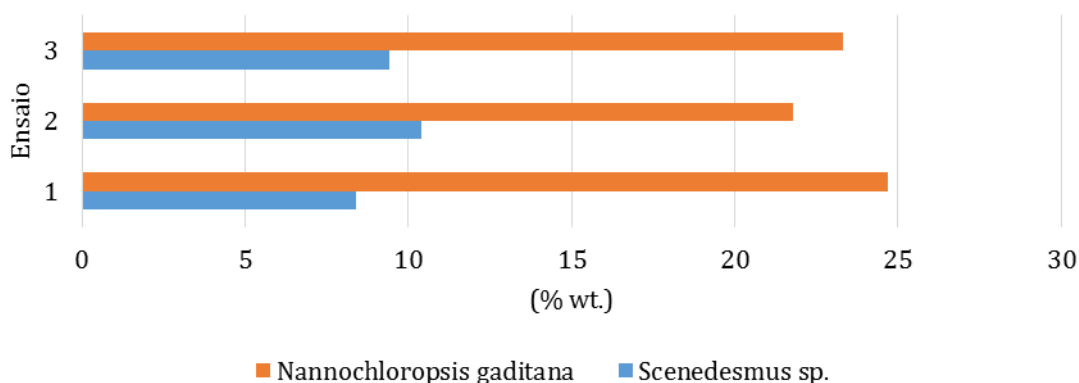


Figura 30: Avaliação do potencial de produção de diferentes espécies

Como se pode verificar pela visualização da Figura 30, obteve-se uma eficiência de extração de aproximadamente 9,4 (wt.%) para a espécie *Scenedesmus sp.* e 24,6 (wt.%) para a espécie *Nannochloropsis gaditana*. Claro que se os métodos de extração e/ou rotura celular fossem outros com certeza os resultados seriam bastante diferentes, no entanto percebe-se que a espécie *Nannochloropsis gaditana* é mais propícia a superiores percentagens de remoção de conteúdo lipídico.

Espécies de microalgas do género *Nannochloropsis*, pertencentes à classe *Eustigmatophyceae* e filo *Heterokontophyta* apresentam elevada quantidade de triglicerídeos e portanto foram utilizadas nos restantes procedimentos experimentais.

4.1.3. Estudo do melhor sistema de solventes

A quantidade de amostra e de solventes utilizados foi aproximadamente igual para todos os ensaios, no entanto, no decorrer do procedimento laboratorial ocorreram perdas associadas por evaporação, nomeadamente aquando da aplicação do solvente diclorometano, cujo ponto de ebulição é relativamente baixo. Neste tipo de análise existem determinadas variáveis a ter em consideração, uma delas é o ponto de ebulição de cada um dos solventes, pois quanto mais elevado este for maior serão os consumos energéticos necessários para a sua evaporação. De acordo com a Tabela 7 os pontos de ebulição dos reagentes diclorometano e isopropanol são 39,6°C e 82,6°C respetivamente, ou seja, a quantidade de energia necessária para evaporar o reagente isopropanol será bastante superior à necessária para evaporar o diclorometano. Uma outra variável a ter em consideração é o consumo de energia associado ao banho de ultrassons. Quanto maior for a viscosidade do solvente utilizado, maior será a resistência imposta à propagação das ondas, resultando assim num maior consumo energético. Em termos de eficiência de

extração, os resultados obtidos com os diferentes solventes orgânicos encontram-se representados na Figura 31.

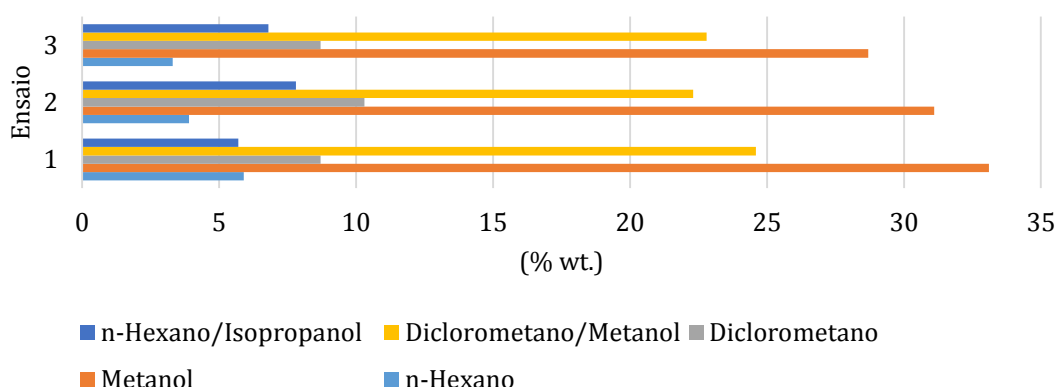


Figura 31: Eficiência de extração de diversos sistemas de solventes

O metanol, foi o solvente que apresentou melhores resultados de extração, situando-se na ordem dos 30,9 (wt.%). O valor obtido com a utilização de metanol pode ser indicativo de dois fatores distintos. Pode ser indicador das características mais polares dos lípidos extraídos, por outro lado, a eficiência de extração com metanol pode dever-se a um elevado grau de arrastamento de resíduos sólidos por parte do álcool.

O uso da mistura diclorometano e metanol proporcionou uma eficiência de extração de 23,2 (wt.%), valor este relativamente baixos em relação ao esperado. O diclorometano possui uma polaridade intermédia e o metanol é fortemente polar, esta conjugação de solventes apresenta grande facilidade em extrair componentes apolares assim como polares. A possível explicação para esta mistura de reagentes não conseguir melhores resultados terá sido o facto de os lípidos extraídos apresentarem características que não se enquadram com a aplicação deste tipo de sistema de solventes, no entanto a sua aplicabilidade depende da finalidade do produto extraído e das limitações logísticas inerentes à sua aplicação/utilização.

Considerando um único solvente, o diclorometano apresenta uma eficiência de remoção de 9,4 (wt.%). Como era de se esperar, verificou-se que o diclorometano apresenta uma capacidade de extração inferior ao valor anterior, uma vez que não contempla a funcionalidade do álcool. Neste caso, a “responsabilidade” da extração é exclusivamente das características do diclorometano, exibindo assim um valor mais reduzido relativamente à mistura de diclorometano com metanol.

A mistura de n-hexano com isopropanol surge com uma capacidade de extração na ordem dos 6,8 (wt. %). O n-hexano é um solvente considerado apolar, o que favorece a extração de lípidos com características apolares. O valor de extração com n-hexano é um valor de

referência, uma vez que teoricamente, a extração realizada pelo n-hexano permite recuperar os lípidos neutros (triglicerídeos) favoráveis à produção de biocombustíveis. Ao se utilizar uma mistura de n-hexano com isopropanol, sendo este polar, seriam de se esperar ótimos resultados, no entanto tal não se verificou, o que realça a ideia que as características lipídicas da espécie de microalgas em análise sejam polares.

Como já foi referido anteriormente, a eficiência das extrações foi realizada em termos quantitativos pela pesagem do conteúdo lipídico resultante de cada ensaio de extração. Nesta medida, os resultados obtidos não são indicativos do melhor processo em termos químicos, uma vez que é desconhecida a qualidade do óleo extraído. A utilização de diclorometano nas extrações de óleo para conversão em biodiesel poderá não ser vantajosa por este não ser seletivo relativamente aos lípidos extraídos, assim como pelo perigo e toxicidade inerente do uso deste solvente a nível industrial.

Se os resultados mostrados na Figura 31 representassem somente extração lipídica, o solvente de seleção seria o metanol, no entanto os resultados não são esclarecedores acerca do tipo de lípidos extraídos, não sendo possível dizer com certeza o mais viável a aplicar numa escala (de grandeza) industrial.

4.1.4. Redução do tempo de utilização do banho de ultrassons

Durante o processo de extração lipídica foi utilizado como método auxiliar de extração o banho de ultrassons, tendo a amostra sido sujeita a ondas sonoras durante 30 minutos. Com o objetivo de perceber se existem alterações na eficiência de extração com a diminuição do respetivo tempo de operação, foram realizados três ensaios com três diferentes sistemas de solventes orgânicos para diferentes tempos de operação em ultrassons. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 32.

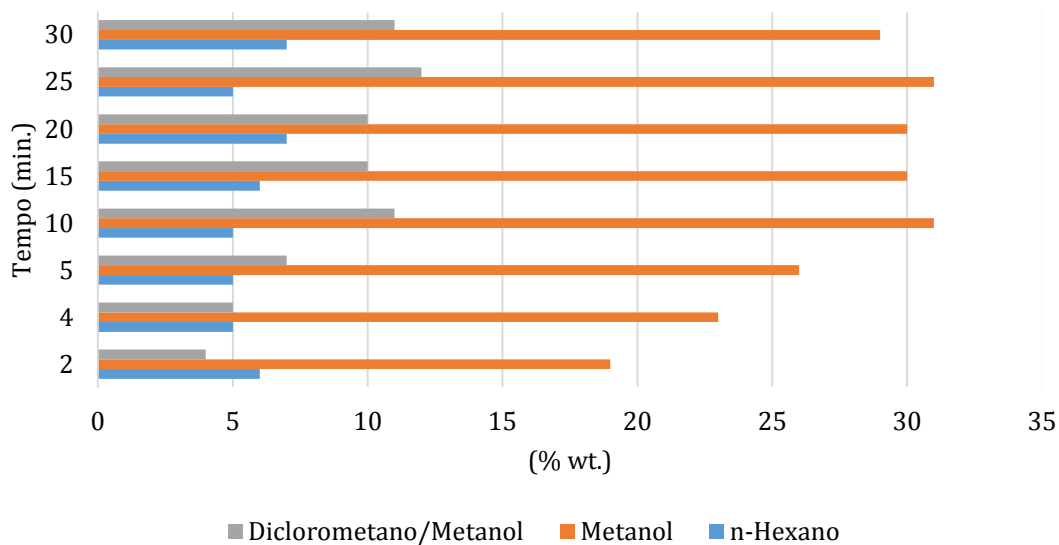


Figura 32: Extração com n-hexano, metanol e diclorometano/metanol para vários tempos de operação

De acordo com a Figura 32 é possível verificar que para o solvente metanol e sistema de solventes diclorometano/metanol a eficiência de extração é praticamente a mesma se variar o tempo entre 10 e 30 minutos, começando esta apenas a reduzir quando se aplica o respetivo processo mecânico para intervalos de tempo inferiores a 10 minutos. Para o solvente n-hexano, esta redução não se verifica, pois a percentagem de lípidos que se consegue extrair com a utilização deste solvente é relativamente reduzida, e portanto não se consegue visualizar uma diferença significativa quando se varia o tempo de utilização do banho de ultrassons. Botelho (2008) verificou que a percentagem de extração, realizada com diferentes solventes, começa a diminuir a partir dos 4 minutos. A respetiva diferença de resultados obtidos pode estar relacionada com os procedimentos ou tipo de matéria-prima utilizada, no entanto percebe-se que existe um período de tempo cuja eficiência de extração é relativamente constante, não havendo necessidade de grandes períodos de operação do banho de ultrassons. Esta redução de tempo permite processar o material de uma forma mais rápida bem como angariar poupanças relacionadas com os consumos energéticos.

4.2. Produção de Biodiesel – Transesterificação Catalítica

Atualmente, a produção de biodiesel utilizando microalgas como matéria-prima é realizada, essencialmente, através da extração dos lípidos presentes na biomassa e respetiva transesterificação para conversão do óleo em biodiesel. Um método mais

simples, designado por transesterificação direta, também conhecido por transesterificação *in situ*, tem sido também utilizado pois apresenta algumas vantagens em relação ao método tradicional, consiste num processo onde se realiza a reação de transesterificação diretamente sobre a biomassa, não sendo necessário proceder ao passo de extração de lípidos. Como o principal objetivo da presente dissertação consiste na otimização das técnicas de extração optou-se por não utilizar este tipo de método por forma a valorizar os resultados obtidos no decorrer da fase de extração lipídica. Assim sendo utilizou-se um processo de conversão utilizando um catalisador ácido, nomeadamente recorrendo ao ácido clorídrico. A opção por este tipo de catalisador, foi essencialmente para evitar problemas relacionados com o fenómeno de saponificação. As condições a nível das quantidades de reagentes utilizados e tempo de reação dos primeiros ensaios foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos pela investigadora do centro de Tecnologia Mecânica e Automação, Smritikana Dutta, no entanto, com a aplicação destas condições, ocorreram algumas dificuldades para converter o óleo proveniente da fase de extração lipídica, optando-se por adaptar o respetivo método ao apresentado em 3.5., com a alteração do respetivo tempo de reação. Os resultados obtidos com a aplicação deste procedimento são apresentados no Quadro 12.

Quadro 11: Resultado obtido no processo de produção de biodiesel

	m óleo (g)	eficiência de extração (wt.%)
Extração do conteúdo lipídico	1,01	20,2
	m biodiesel (g)	eficiência de conversão (wt.%)
Transesterificação Catalítica	0,18	17,8

$$Eficiência\ de\ Conversão\ (wt.\%) = \frac{m\ biodiesel\ (g)}{m\ conteúdo\ lipídico\ (g)} \times 100$$

Os resultados obtidos no processo de transesterificação mostram que é possível converter óleo proveniente de microalgas em biodiesel, conseguiu-se uma eficiência de conversão de 17,8 (wt.%) para a espécie *Nannochloropsis gaditana*. Este resultado não é suficientemente esclarecedor relativamente à qualidade do biodiesel, havendo a necessidade de recorrer a cromatografia gasosa para traçar o perfil de ácidos gordos e analisar a sua viabilidade para se poder utilizar em motores de combustão.

5. Conclusão e Trabalhos Futuros

O presente trabalho teve como principal objetivo a avaliação e otimização das técnicas de extração de biodiesel de elevada qualidade a partir de microalgas previamente secas. *Nannochloropsis gaditana* e *Scenedesmus sp.* foram utilizadas como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel. Essa avaliação foi feita através do estudo da otimização do processo de rotura celular, determinação do potencial de produção das diferentes espécies em análise e estudo de diferentes sistemas de solventes de extração. Estudou-se ainda o processo de transesterificação catalítica aplicável apenas à espécie *Nannochloropsis gaditana*.

Relativamente à conjugação de um processo mecânico com o método de extração via solvente orgânico, conclui-se ser uma medida bastante eficaz que eleva significativamente a eficiência de extração. Com a aplicação desta operação obteve-se um acréscimo no rendimento de extração na ordem dos 42%.

Os resultados obtidos para as extrações com diclorometano/metanol (2:1) em função do método mecânico aplicado (banho de ultrassons) mostram que, para as mesmas condições de cultura e de colheita, a espécie *Nannochloropsis gaditana* apresenta um potencial de produção de biodiesel superior à espécie *Scenedesmus sp.*, obtiveram-se eficiências de extração de 24,6 (wt.%) e 9,4 (wt.%), respetivamente.

De uma forma geral, chegou-se à conclusão que o solvente metanol e sistema de solventes diclorometano/metanol são os que apresentam uma superior eficiência de remoção lipídica, 30,9 (wt.%) e 23,2 (wt.%). No entanto a sua seleção depende de uma análise qualitativa do óleo extraído. Relativamente à aplicação do n-hexano e sistema de solventes n-hexano/isopropanol seriam de esperar melhores resultado de extração, no entanto tal não se verificou, o que realça mais uma vez a ideia de ter que se aplicar um método qualitativo para proceder à avaliação das características dos lípidos presentes nas respetivas microalgas.

A variação do tempo de operação do banho de ultrassons permitiu verificar que para intervalos de operação a variar entre 10-30 minutos a eficiência de extração é praticamente a mesma, ou seja, é possível processar o material de forma mais rápida, rentabilizando assim o processo em termos de consumos energéticos.

No processo de transesterificação os resultados obtidos indicam que, para 5 g de biomassa, um tempo de reação de 12 horas, volume de metanol de 30 ml e uma concentração de catalisador de 1,2% (v/v), é possível obter uma eficiência de conversão de óleo em biodiesel na ordem dos 17,8 (wt.%) para a espécie *Nannochloropsis gaditana*. Este valor indica que o processo de transesterificação utilizado permite a conversão

completa do conteúdo lipídico presente na biomassa em biodiesel. No entanto seria necessário proceder à caracterização do perfil dos ácidos gordos através de cromatografia gasosa para averiguar se biodiesel resultante cumpre ou não com os requisitos apresentados pela Norma EN 14214:2008.

Com a realização deste trabalho e da experiência obtida, seguidamente são apresentadas algumas sugestões para complementar o trabalho desenvolvido.

- Sugere-se a realização de ensaios recorrendo aos outros métodos mecânicos para rotura celular, nomeadamente, micro-ondas, moinho de bolas, autoclave etc.;
- Para se poder obter conclusões mais esclarecedoras das extrações realizadas, é estritamente necessário proceder a uma caracterização qualitativa do respetivo óleo, tanto para caracterizar o melhor solvente de extração como para prever a qualidade do produto final;
- Recorrer ao método de transesterificação direta, de forma a perceber se existe grande discrepância de resultado, se tal não se verificar pode ser considerada uma excelente medida de otimização, pois são reduzidas várias etapas do processo, nomeadamente a extração lipídica e a evaporação dos solventes, com a consequente diminuição de custos energéticos associados e tempo despendido.

Referências Bibliográficas

1. SANTOS, Marta – Novas tecnologias de colheita de microalgas para a produção de biodiesel. **Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente**. Universidade de Lisboa, 2013.
2. REBELO, Ricardo – Produção de Biodiesel a partir de Microalgas. Revisão Bibliográfica e Contribuição para a sua Produção em Portugal. **Dissertação de Mestrado em Engenharia do Ambiente**. Universidade Nova de Lisboa, 2014.
3. Eurostat European Commission – Energy, transport and environment indicators. **Eurostat Pocketbooks**. European Union, 2014. ISSN 1725- 4566.
4. Parlamento Europeu e do Conselho de 8 de Maio de 2003. **Diretiva 2003/30/CE** – Promoção da Utilização dos Biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes. 17/05/2003.
5. Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Abril de 2009. **Diretiva 2009/28/CE** – Promoção da Utilização de Energias Provenientes de Fontes Renováveis. 05/06/2009.
6. Parlamento Europeu e do Conselho de 5 de Abril de 2006. **Diretiva 2006/32/CE** – Eficiência na utilização final de energia e aos serviços energéticos. 27/04/2006.
7. DGES – Direção Geral de Energia e Geologia, 2014. **Estatísticas e Preços – Balanços e Indicadores Energéticos** [Em linha]. Governo de Portugal. [Consult. 05 Mar. 2015]. Disponível em WWW: <URL:<http://www.dgeg.pt/>>.
8. Governo de Portugal - **PETI 3+ - Plano Estratégico dos Transportes e Infraestruturas (Crescimento, Coesão e Competitividade)** [Em linha]. Ministério da Economia, 2014. [Consult. 20 Mar. 2015]. Disponível em WWW: <URL: <http://www.portugal.gov.pt/media/1385664/PETI3.pdf>>.
9. *Decreto-lei nº 39/2013*, 18/03/2013.
10. *Decreto-lei nº 49/2009*, 26/02/2009.
11. EurObserv'ER – Biofuels Barometer, 2014 - **A study carried out by EurObserv'ER** [Em linha]. [Consult. 02 Abr. 2015]. Disponível em WWW: <URL: <http://www.eurobserv-er.org/biofuels-barometer-2014/>>.
12. GUIMARÃES, Daniel. – Novas Tecnologias de Produção de Biocombustíveis: Potencial para o Sistema Energético Português. **Dissertação de Mestrado em Engenharia do Ambiente**. Universidade Nova de Lisboa, 2013.
13. NIGAM, Poonam; SINGH, Anoop – Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**. ISSN 03601285. 37:1-(2011) 52-68.

14. CHISTI, Yusuf – Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**. ISSN 01677799. 26-(2008) 126-131.
15. BAJAJ, Akhil; LOHAN, Purva; JHA, Prabhat; MEHROTRA, Rajesh – Biodiesel production through lipase catalysed transesterification: An Review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. ISSN 13811177. 62-(2010) 9-14.
16. ATABANI, A.; SILITONGA, A.; BADRUDDIN, Irfan; MAHLIA, T.; MASJUKI, H.; MEKHILEF, S. – A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. ISSN 13640321. 14:4-(2012) 2070-2093.
17. SUBRAMANIAM, D.; MURUGESAN, A.; KUMARAVEL, A. – Bio-diesel production and its engine characteristics - An expatiate view. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. ISSN 13640321. 22-(2013) 361-370.
18. SOARES, Nuno – Valorização dos Óleos Alimentares Usados para Produção e Utilização de Biodiesel à Escala Municipal. **Dissertação de Mestrado em Engenharia do Ambiente**. Universidade Técnica de Lisboa, 2010.
19. MELERO, Juan; VICENTE, Gemma; MORALES, Gabriel; PANIAGUA, Marta; BUSTAMANTE, Javier – Oxygenated compounds derived from glycerol for biodiesel formulation: Influence on EN 14214 quality parameters. **Fuel**. ISSN 00162361. 89:8-(2010) 2011-2018.
20. EPA – Environmental Protection Agency, 2002. A Comprehensive Analysis of Biodiesel Impacts on Exhaust Emissions. **Draft Technical Report**. Assessment and Standards Division Office of Transportation and Air Quality [Em linha]. [Consult. 11 Mai. 2015]. Disponível em WWW: <URL: <http://www.epa.gov/otaq/models/analysis/biodsl/p02001.pdf>>.
21. MATA, Teresa; MARTINS, António; CAETANO, Nidia – Microalgae for biodiesel production and other application: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. ISSN 13640321. 14-(2010) 217-232.
22. TABATABAEI, Meisam; TOHIDFAR, Masoud; JOUZANI, Gholamreza; SAFARNEJAD, Mohammadreza; PAZOUKI, Mohammad – Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Future of bioenergy in Iran. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. ISSN 13640321. 15:4-(2011) 1918- 1927.
23. AHMAD, A.; YASIN, N.; DEREK, C.; LIM, J.; - Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. ISSN 13640321. 15:1-(2011) 584-593.

24. KIRROLIA, Anita; BISHNOI, Narsi; SINGH, Rajesh – Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. ISSN 13640321. 20-(2013) 642-656.
25. GALLAGHER, Brien – The economics of producing biodiesel from algae. **Renewable Energy**. ISSN 09601481. 36:1-(2011) 158-162.
26. FRANCO, André; LÔBO, Ivon; CRUZ, Rosenira – Biodiesel de Microalgas: Avanços e Desafios. **Química Nova**. ISSN 01004042. 36:3-(2013) 437-448.
27. ROLEDA, Michael; SLOCOMBE, Stephen; LEAKEY, Raymond; DAY, John; BELL, Elanor; STANLEY, Michele – Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. **Bioresource Technology**. ISSN 09608524. 129-(2013) 439-449.
28. MOHAN, S.; ROHIT M.; CHIRANJEEVI, P.; CHANDRA, Rashmi; NAVANEETH, B. – Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. **Bioresource Technology**. ISSN 09608524. 184-(2015) 169-178.
29. BELKIN, Shimshon; BOUSSIBA, Sammy – Resistance of *Spirulina platensis* to ammonia at high pH values. **Plant and cell physiology**. ISSN 00320781. 32:7-(1991) 953-958.
30. WEISSE, Thomas; STADLER, Peter – Effects of pH on growth, cell volume, and production of freshwater ciliates, and implications for their distribution. **Limnology and Oceanography**. ISSN 00243590. 51:4-(2006) 1708 -1715.
31. RAWAT, I.; KUMAR, R.; MUTANDA, T.; BUX, F. – Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**. ISSN 03062619. 103-(2013) 444-467.
32. JORQUERA, Orlando; KIPERSTOK, Asher; SALES, Emerson; EMBIRUÇU, Marcelo; GHIRARDI, Maria - Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. **Bioresource Technology**. ISSN 09608524. 101:4-(2010) 1406–1413.
33. BENAVIDES, Ana; TORZILLO, Giuseppe; KOPECKY, Jirka; MOSAJIDEK, Jiri – Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. **Biomass and Bioenergy**. ISSN 09619534. 54:0 (2013) 115-122.

34. BARROS, Ana; GONÇALVES, Ana; SIMÕES, Manuel; PIRES, José - Harvesting techniques applied to microalgae : A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. ISSN 13640321. 41-(2015) 1489-1500.
35. CHRISTENSON, Logan; SIMS, Ronald - Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnology Advances**. ISSN 07349750. 29:6-(2011) 686-702.
36. SHOW, Kuan; LEE, Duu - Chapter 5 - Algal Biomass Harvesting. **Biofuels from Algae**. 85-110, 2014.
37. UDUMAN, Nyomi; QI, Ying; DANQUAH, Michael; FORDE, Gareth; HOADLEY, Andrew - Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**. ISSN 19417012. 2-(2010).
38. SHELEF, G.; SUKENIK, A - Microalgae Harvesting and Processing: A Literature Review. 0-(1984) 65.
39. PETRUSEVSKI, B.; BOLIER, G.; BREEMEN, A. - Tangential flow filtration: A method to concentrate freshwater algae. **Water Research**. ISSN 00431354. 29-(1995) 1419-1424.
40. LEE, Andrew K.; LEWIS, David M.; ASHMAN, Peter J. - Harvesting of marine microalgae by electroflocculation: The energetics, plant design, and economics. **Applied Energy**. ISSN 03062619. 108-(2013) 45-53.
41. HORIUCHI, Jun-Ichi; OHBA, Ichigaku; TADA, KIYOSHI; BOBAYASHI, Masayoshi; KANNO, Tohru; KISHIMOTO, Michimasa - Effective cell harvesting of the halotolerant microalga *Dunaliella tertiolecta* with pH control. **Journal of bioscience and bioengineering**. . ISSN 1389-1723. 95:4-(2003) 412-415.
42. LEE, Andrew; LEWIS, David; ASHMAN, Peter - Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. **Biomass and Bioenergy**. ISSN 09619534. 46-(2012) 89-101.
43. KIM, Jungmin; YOO, Gursong; LEE, Hansol; LIM, Juntaek; KIM, Kyochan; KIM, Chum; PARK, Min; YANH, Ji - Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**. ISSN 07349750. 31:6-(2013) 862-876.

44. LEE, Ilgyu; HAN, Jong-in - Simultaneous treatment (cell disruption and lipid extraction) of wet microalgae using hydrodynamic cavitation for enhancing the lipid yield. **Bioresource Technology**. ISSN 09608524. 186-(2015) 246–251.
45. DAI, Yong; CHEN, Kung; CHEN, Chiing – Study of the microwave lipid extraction from microalgae for biodiesel production – **Chemical Engineering Journal**. ISSN 13858947. 250-(2014) 267–273.
46. CHENG, Chen; DU, Tz;PI, Hsien; JANG, Shyue; LIN, Yun; LEE, Hom - Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO₂. **Bioresource Technology**. ISSN 09608524. 102-(2011) 10151–10153.
47. LEE, Jae; YOO, Chan.; JUN, So; AHN, Chy; OH, Hee - Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**. ISSN 09608524. 101-(2010) 75-77.
48. BOTELHO, Gilberto - Investigação de técnicas de extração de óleo a partir de biomassa. **Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica**. Universidade de Aveiro, 2008.
49. HALIM, Ronald; HARUN, Razif; DANQUAH, Michael; WEBLEY, Paul - Microalgal cell disruption for biofuel development. **Applied Energy**. ISSN 03062619. 91:1-(2012) 116–121.
50. SHIRGAONKAR, Z.; LOTHE, R.; PANDIT, B. – Comments on the mechanism of microbilla cill disruption in high-pressure and high-speed devices. **Biotechnology Progress**. 14:4-(1998) 657-660.
51. ASHOKKUMAR, Veeramuthu; AGILA, Elango; SIVAKUMAR, Pandian; SALAM, Zainal; RENGASAMY, Ramasamy; ANI, Farid - Optimization and characterization of biodiesel production from microalgae Botryococcus grown at semi-continuous system. **Energy Conversion and Management**. 88-(2014) 936–946.
52. FULS, J.; HAWKINS, C.; HUGO, F. Tractor engine performance on sunflower oil fuel. **Journal of Agricultural Engineering Research**. 30-(1984) 29-35.
53. KIM, Jungamin; YOO, Gursong; LEE, Hansol; LIM Juntaek; KIM, Kyochan; KIM, Chul; PARK, Min; YANG, Ji – Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**. ISSN 07349750. 31:6-(2013)862-876.

54. SCHUCHARDT, Ulf; SERCHELI, Ricardo; MATHEUS, Rogério - Transesterification of Vegetable Oils : a Review. **Journal Brazilian Chemical Society**. 9:1-(1998) 199–210.
55. VICENTE, Gemma; MARTÍNEZ, Mercedes; ARACIL, José - Integrated biodiesel production: A comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresource Technology**. ISSN 09608524. 92-(2004) 297–305.
56. FUKUDA, Hideki; KONDO, Akihiko; NODA, Hideo - Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. ISSN 13891723. 92:5-(2001) 405–416.
57. KAWASHIMA, Ayato; MATSUBARA, Koh; HONDA, Katsuhisa - Acceleration of catalytic activity of calcium oxide for biodiesel production. **Bioresource Technology**. ISSN 09608524. 100:2-(2009) 696–700.
58. JEGANNATHAN, R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, S.; RAVINDRA, P. - Production of biodiesel using immobilized lipase: a critical review. **Critical Reviews in Biotechnology**. 28-(2008) 253-264.
59. SUALI, Emma; SARBATLY, Rosalam - Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. ISSN 13640321. 16:6-(2012) 4316–4342.
60. UMDU, Emin; TUNCER, Mert; SEKER, Erol - Transesterification of Nannochloropsis oculata microalga's lipid to biodiesel on Al₂O₃ supported CaO and MgO catalysts. **Bioresource Technology**. ISSN 09608524. 100-(2008) 2828-2831.
61. PATIL, Prafulla; GUDE, Veera; MANNARSWAMY, Aravind; COOKE, Peter; NIRMALAKHANDAN, Nagamany; LAMMERS, Peter; DENG, Shuguang - Comparison of direct transesterification of algal biomass under supercritical methanol and microwave irradiation conditions. **Fuel**. . ISSN 00162361. 97-(2012) 822–831.
62. RAWAT, I.; KUMAR, R.; BUX, T. - Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**. ISSN 03062619. 103-(2013) 444–467.
63. EHIMEN, A.; SUN, F.; CARRINGTON, G. - Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. **Fuel**. ISSN 00162361. 89:3-(2010) 677–684.

-
64. XU, Lixian; BRILMAN, Derk; WITHAG, Jan; BREM, Gerrit; KERSTEN, Sascha – Assessment of a dry and a wet route for the production of biofuels from microalgae: Energy balance analysis. **Bioresource Technology**. ISSN 09608524. 102-(2011) 5113-5122.
65. YOUNG, G.; NIPPEN, F.; TITTERBRANDT, S.; COONEEY, J. – Direct transesterification of biomass using an ionic liquid co-solvent system. **Biofuels**. 6 – (2011) 2-261.

